



HAL
open science

Rôle des systèmes toxine antitoxine de *Sinorhizobium meliloti* au cours de l'interaction symbiotique avec *Medicago sp.*

Justine Lipuma

► **To cite this version:**

Justine Lipuma. Rôle des systèmes toxine antitoxine de *Sinorhizobium meliloti* au cours de l'interaction symbiotique avec *Medicago sp.*. Sciences agricoles. Université Nice Sophia Antipolis, 2015. Français. NNT : 2015NICE4044 . tel-03270764

HAL Id: tel-03270764

<https://theses.hal.science/tel-03270764>

Submitted on 25 Jun 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE

Pour obtenir le titre de Docteur en Sciences

Discipline : Interactions Moléculaires et Cellulaires

Rôle des systèmes Toxine Antitoxine de
Sinorhizobium meliloti au cours de l'interaction
symbiotique avec *Medicago sp.*

Présentée et soutenue par

Justine Lipuma

Institut Sophia Agrobiotech (ISA)

Equipe Symbiose et état redox de la cellule

Travaux réalisés sous la direction du Dr Laurence Dupont

Soutenue le 06 Juillet 2015 devant la commission d'examen composée de :

Marylène Poirié Professeur à l'Université de Nice Sophia Antipolis, Président

Laurence Van Melderren Professeur à l'Université Libre de Bruxelles (ULB), Rapporteur

Claude Bruand Directeur de Recherche au LIPM à Toulouse, Rapporteur

Paola Bonfante Professeur à l'Université de Turin (UNITO), Examineur

Isabelle Garcia Maître de conférence à l'Université Nice Sophia Antipolis, Examineur

Laurence Dupont Maître de conférence à l'Université Nice Sophia Antipolis, Directeur de thèse

REMERCIEMENTS :

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury d'avoir accepté de juger mon travail de thèse. Merci à mes deux rapporteurs, le Dr Claude Bruand et le Pr Laurence Van Melderen. Merci au Pr Marylène Poirié d'avoir bien voulu présider ce jury et au Pr Paola Bonfante d'avoir accepté d'examiner ce travail et participer au jury de soutenance.

Je tiens également à remercier ma directrice de thèse Laurence Dupont. Merci de m'avoir attrapée au vol en Licence pour me donner le goût de la recherche, de la microbiologie et m'avoir fait croire en moi, et au fait que je pouvais réaliser cette thèse. Merci pour ta patience, ta passion que tu m'as transmise, pour ton exigence et ta rigueur. Au delà de cela, merci pour ton humour, tes rires et pour m'avoir apportée tant de choses. Je continue chez les « Toxic girls » avec un grand merci à Lili. Merci pour tout ce que tu m'as apportée depuis 5 ans maintenant... : tes conseils, ton aide et tes rires. Je te souhaite plein de bonnes choses et j'espère que ton petit bouchon va bien vouloir attendre ma soutenance pour pointer le bout de son nez. Et enfin la dernière arrivée des « Toxic », Yza : un grand merci pour ta venue dans ce groupe TA, merci pour tous mes supers gâteaux d'anniversaire. Merci pour ton soutien jusqu'au bout dans cette thèse. Il y a quelques touches de masculinité dans cette team « Toxic » : merci à Raph ou plutôt George Cloner. C'était un grand plaisir de travailler avec toi, je te souhaite bonne route pour la suite et de continuer à t'éclater. L'autre touche masculine, c'est Nico qui nous a rejoint le temps d'un beau projet qui, je l'espère, va bientôt aboutir. Merci pour tes conseils techniques et scientifiques, merci pour ta super énergie et au delà de ça, merci pour m'avoir donnée goût à la symbiose pendant tes cours de licence.

Une thèse, c'est un travail de recherche dans une équipe... Et quelle équipe ... l'équipe Symbiose ! Ou aussi appelé « Les irréductibles gaulois » ! Merci à vous tous pour votre aide, notamment durant mes longues séances de dénodulation qui rendent aveugle... Merci aussi pour tout ce qu'il y a eu à côté des manip : les pots, les repas de Noël, les soirées, les rires...

Merci à notre team leader Pierre, pour ton aide sur les papiers notamment mais aussi pour nos sorties aux salons des vigneron et je n'oublierai pas les quelques fois où tu as bien voulu courir avec nous... un grand moment ! Renaud et Claude, nos biochimistes, merci pour votre expertise et votre aide. Renaud, l'année prochaine rendez-vous aux « Allumés de la pleine lune », sans faute... Imène, Carolina et Martina, merci pour votre soutien, surtout pendant cette vilaine période d'écriture. Merci d'avoir pris des nouvelles de l'ours caché dans sa grotte... Plein de bonnes choses pour vous pour la suite. Alex, un grand merci pour tous les souvenirs de sorties, de Beach volley, etc... c'était vraiment chouette. Merci aussi d'être toujours là, prêt à aider pour des manips ou monter des figures. Isa, maintenant que tu recommence à courir avec Marie, à quand le semi-marathon ? Merci pour tes encouragements pour la thèse et les courses. Marie, quand j'écris Marie, je pense madeleines, c'est étrange... un grand merci pour ton soutien et pour tes supers madeleines quand même... Alain, merci pour tes mots d'encouragement, chaque fois que je passais devant ton bureau. Gégé, un immense merci pour ton aide de chaque instant dans cette thèse du début à la fin, de la rédaction aux manips, merci pour tes encouragements, pour m'avoir longtemps transportée de Nice à

Sophia, pour nos discussions musiques et cinéma, pour nos sorties Jazz, merci pour tout. Notre So british Julie, merci pour ta bonne humeur, nos sorties, ton soutien depuis longtemps, toi aussi. Et oui j'ai retrouvé des dossiers... Karine, tu es la première à m'avoir parlée de symbiose, d'interactions plantes-micro-organismes, merci pour cette découverte qui m'a inspirée et donnée envie d'en savoir plus. J'en arrive à mon bureau... Rické ! Eric, merci pour m'avoir supportée dans ton dos pendant tout ce temps... Merci pour ton aide dans les manips mais aussi pour nos discussions, nos rires et nos ballades. Je garde en souvenir cette superbe randonnée à Gréolière. Je n'oublie pas Annie et Céline, un grand merci à elles aussi. Merci à Marc pour avoir sauvé mes plantes capricieuses.

Au delà de mon équipe... Merci aux copains d'en haut pour les cafés et les discussions toujours très animées du matin, merci aux SDAR et à notre gourou national qui m'a bien réparée, surtout pour cette fin de thèse. Merci à Armelle pour m'avoir donnée le goût de la com' et du partage d'information, parce que c'est ça aussi la Science, savoir la partager avec les autres. Merci à tous mes enseignants et collègues pour m'avoir dans un premier temps transmise leur passion et l'envie de faire de la recherche, puis pour m'avoir donnée envie d'enseigner à mon tour. L'enseignement a été une expérience passionnante. Merci à mes acolytes de PPG du Mercredi et des sorties courses, ces grands bols d'oxygène étaient essentiels pour moi et nos fous rires aussi. Un mot quand même sur nos « Journal Club » et apéro doc, que de fous rires aussi. Merci à tous les copains thésards et post-doc pour ces moments de convivialité et quand même je ne peux que repenser à notre belle victoire d'Halloween... Merci aux 4 fantastiques pour nos sorties et nos fous rires, pour bien vouloir boire une bière en urgence quand je craque. Je rajoute à ces 4 fantastiques un merci à Loris et Elo, toujours là pour remonter le moral des troupes aussi.

Merci à tous ceux qui se reconnaîtront et qui à différents moments m'ont apportée beaucoup de bonheur pendant toutes ces années à l'INRA, ceux avec qui j'ai partagé, des rires, du sport, des apéros, des repas, des ballades etc...

La thèse c'était aussi les JEDNs, merci à tous ceux qui ont participé à ces supers journées. Chaque année c'était un vrai plaisir de partager ça avec vous.

Merci à mes amis pour leur soutien et pour avoir toujours écouté mes histoires de thèse qui vraiment n'intéressent personne... Merci à Cabric, Claire, Cortex, Julie, Alex, Cha, Thibo, pour leurs soutien de chaque instant et pour être toujours là. Merci à Mathilde d'être tac et de son soutien sans failles.

Enfin je remercie mes parents, mes frères et toute ma famille, pour leur soutien inconditionnel. Merci pour leur aide à tous les niveaux, pour leurs encouragements de tous les instants et pour tout ce qu'ils me donnent chaque jour. Vous êtes ma force.

Je dédicace ce manuscrit à ma mamie Nicole.

RESUME :

L'interaction symbiotique entre la bactérie du sol *Sinorhizobium meliloti* et la plante de la famille des légumineuses *Medicago sp.* conduit au développement d'un nouvel organe racinaire: la nodosité. Au sein de cet organe, les bactéries différenciées en bactéroïdes, réduisent l'azote atmosphérique en ammoniac directement assimilable par la plante, favorisant ainsi sa nutrition azotée. En échange, la plante, grâce à son activité photosynthétique, fournit aux bactéroïdes des composés carbonés. Cette association à bénéfice mutuel n'est toutefois pas permanente. En effet, quelques semaines seulement après l'établissement de la symbiose, une sénescence définie par une dégradation des bactéroïdes puis des cellules végétales, est observée. Cette étape du développement nodositaire est aujourd'hui encore peu étudiée et mal comprise.

L'objectif premier de ce travail était donc d'analyser le rôle du bactéroïde dans cette rupture symbiotique. Pour cela, nous nous sommes plus particulièrement intéressés au rôle des systèmes Toxine Antitoxine (TA) de type VapBC de *S. meliloti*. En effet, ces opérons sont, dans la littérature, connus pour être impliqués dans la réponse aux stress, la persistance et/ou la mort bactérienne ainsi que la survie de la bactérie au sein de la cellule hôte. Dans un premier temps, nous avons développé une analyse globale du rôle des 11 systèmes VapBC chromosomiques de *S. meliloti* dans l'interaction symbiotique. Après une étude *in silico* du profil d'expression de ces systèmes en culture libre et en interaction, nous avons étudié l'effet, lors de la symbiose avec *Medicago sp.*, de chacun des mutants bactériens d'inactivation de la toxine sur le rendement végétal, la capacité fixatrice d'azote et la sénescence des nodosités. Au vu des résultats, nous avons, dans un deuxième temps, développé une analyse approfondie des phénotypes obtenus avec deux de ces mutants : *vapC5* et *vapC7*. Nous avons ainsi montré que, lors de l'interaction symbiotique, une mutation dans le gène de la toxine *vapC5* conduit à une augmentation du rendement végétal couplée à une meilleure activité fixatrice d'azote et une sénescence nodositaire retardée. (Lipuma *et al.*, 2014) alors qu'une mutation analogue, dans le gène de la toxine *vapC7*, conduit à un phénotype opposé, caractérisé par des nodosités aberrantes où la fixation d'azote est presque abolie (article en préparation). Ce travail a donc permis la mise en évidence de rôles majeurs et différents des systèmes TA de type VapBC de *S. meliloti* dans l'interaction symbiotique.

Table des matières

Introduction partie 1 :

Les interactions plantes – micro-organismes

La symbiose légumineuse-rhizobium

I. La rhizosphère et les interactions plantes – micro-organismes :	1
A. La rhizosphère.....	1
B. La variété des interactions plantes-micro organismes.....	3
1. Les interactions de type pathogènes :.....	3
2. Interactions de type symbiotiques : La symbiose mycorrhizienne.....	4
II. La symbiose fixatrice d'azote	5
A. Les bactéries fixatrices d'azote symbiotiques et non symbiotiques	7
B. Les partenaires de la symbiose rhizobium- légumineuses.....	7
1. Les légumineuses.....	8
2. Les rhizobia	9
C. Mise en place, organogenèse des nodosités et fixation d'azote.....	10
1. Dialogue moléculaire et reconnaissance plante-bactérie	10
2. Organogenèse	11
3. Devenir des bactéries dans la nodosité fonctionnelle	12
D. Sénescence nodositaire	19
1. Mise en place du processus de sénescence : changements structuraux	19
2. Etat redox et sénescence.....	20
3. Gènes de plantes induits lors de la mise en place du processus de sénescence nodositaire	22
4. Gènes bactériens impliqués dans la rupture de l'interaction symbiotique.....	22

Introduction partie 2 :

Les systèmes Toxines Antitoxines (TA)

I. Définition d'un système Toxine Antitoxine (TA)	26
II. LA DECOUVERTE DES SYSTEMES TA	26
A. Les TA plasmidiques.....	26
B. Les TA chromosomiques	27
III. Les différents types de systèmes TA.....	28
A. Les systèmes TA dont l'antitoxine est un ARN : types I et III	28
B. Les systèmes TA où l'antitoxine est une protéine : type II et V	29
C. Les systèmes TA sans interaction directe entre toxine et antitoxine : le type IV.....	30
IV. LES MODES D'ACTION ET LES CIBLES MOLECULAIRES DES TOXINES DES SYSTEMES TA .	31
A. L'altération de l'intégrité cellulaire.....	31
1. L'altération de la membrane bactérienne.....	31
2. Les modifications du cytosquelette cellulaire et de la division cellulaire.....	31
3. L'action sur le peptidoglycane.....	32
B. L'inhibition de la réplication de l'ADN	32
C. La répression de l'expression génique	32
1. L'inhibition de la traduction	32

2. Les ARN interférasés dépendantes des ribosomes	33
3. Les ARN interférasés indépendantes du ribosome	33
V. La régulation de l'expression des systèmes TA de type II.....	35
A. La régulation transcriptionnelle : motif de liaison à l'ADN de l'antitoxine	35
B. La dégradation des antitoxines par les protéases.....	37
C. Les régulations croisées des systèmes TA	37
D. Les signaux d'induction de l'expression des systèmes TA (exemple chez <i>M. tuberculosis</i>).....	38
E. La régulation de l'expression des systèmes TA par des protéines chaperonnes : cas des systèmes TAC 39	
VI. Les rôles biologiques des systèmes TA de type II	40
A. Le suicide altruiste ou Mort cellulaire programmée (PCD=Programmed cell death)	40
B. La régulation globale du métabolisme cellulaire et la persistance bactérienne	42
1. La régulation du métabolisme cellulaire	42
2. La persistance cellulaire : cas des bactéries pathogènes	42
C. Les gènes TA : des gènes égoïstes ?	44
D. Le maintien et la survie dans la cellule hôte : exemple de la famille VapBC	46
1. Les systèmes VapBC : facteurs de virulence ?	46
2. Les systèmes VapBC : rôle chez les bactéries symbiotiques	47

Résultats Partie 1 :

Analyse globale des systèmes Toxine Antitoxine de type II de la famille VapBC chez *S. meliloti*

I. Les systèmes TA chromosomiques de type II de <i>S. meliloti</i>	53
A. Cartographie des systèmes TA de type II	53
B. Environnement génétique des opérons <i>vapBC</i> de <i>S. meliloti</i>	54
C. Homologies de séquences des protéines VapC et VapB et prédictions de structure tridimensionnelle.....	56
1. Les toxines VapC.....	56
2. Les antitoxines VapB	58
D. Démonstration fonctionnelle des systèmes Toxine Antitoxine VapBC putatifs de <i>S. meliloti</i>	59
II. Profil d'expression des opérons <i>vapBC</i> de <i>S. meliloti</i>	60
A. Expression des opérons TA <i>vapBC</i> en culture	60
B. Expression des opérons <i>vapBC</i> dans les différentes zones de la nodosité fonctionnelle	61
III. Phénotypes des mutants d'inactivation de la toxine des différents systèmes VapBC de <i>S. meliloti</i>	62
A. Phénotype des mutants d'inactivation des toxines VapC de <i>S. meliloti</i> en culture	62
B. Phénotype des mutants d'inactivation des toxines VapC de <i>S. meliloti</i> en symbiose avec <i>M. truncatula</i>	63

Résultats Partie 2 : Le système VapBC5

Acteur clef de la sénescence nodositaire et de l'efficacité symbiotique.....66

Résultats Partie 3 :

Le système VapBC7 :

Un système toxine antitoxine essentiel a la survie de la bacterie dans la cellule hôte.....87

Conclusions générales et perspectives

I. Les systèmes TA de la famille VapBC jouent un rôle majeur dans la symbiose avec <i>Medicago sp.</i>	124
A. Etude des mutants <i>vapC</i>	124
B. Les systèmes VapBC : rôle comme régulateur global pour l'adaptation de <i>S. meliloti</i> à la vie symbiotique ?	125
C. Liens entre expression des gènes <i>vapBC</i> et phénotypes symbiotiques ?	129
D. Rôle symbiotique des systèmes VapBC dépendant de l'espèce de <i>Medicago</i> ?.....	131
E. Analogie avec le rôle des systèmes VapBC de bactéries pathogènes humaines.....	132
II. Rôle de l'antitoxine	134
III. Intérêt agronomique des systèmes TA.....	136
IV. Evolution et systèmes TA	138

Matériels et méthodes

I. Matériels biologiques	140
A. Production de matériel végétal.....	140
B. Cultures bactériennes	140
II. Mesure de la capacité fixatrice d'azote des plantes et du rendement végétal :.....	141
A. La capacité fixatrice d'azote.....	141
B. Mesure du rendement végétal :	141
III. Techniques d'histologie	142
A. Ultrastructure des nodosités : protocole de Technovit	142
B. Mesure de la viabilité des bactéroïdes <i>in vivo</i> en utilisant la sonde LiveDead	142
C. Mesure de l'accumulation d'anion superoxide dans la nodosité par la coloration au Nitrobleu Tétrazolium (NBT).....	143
D. Mesure de l'endoreduplication des bactéroïdes et des cellules de plantes dans la nodosité par cytométrie en flux.....	143
IV. Techniques de biologie moléculaire	144
A. Amplification d'ADN par PCR	144
B. Analyse d'expression de marqueurs moléculaires sur nodosités par mesure qPCR.....	144
C. Construction des souches mutantes VapC : stratégie de clonage et méthode.....	145
D. Tests de toxicité chez <i>E. coli</i>	145
V. Techniques de microbiologie.....	146
A. Préparation de cellules thermo-compétentes et transformation.....	146
B. Conjugaison triparentale.....	146
C. Analyse de l'expression des opérons <i>vapBC5</i> et <i>vapBC7</i>	146

VI. Biochimie	147
A. Expression et purification de la toxine VapC7.....	147
B. Caractérisation <i>in vitro</i> de l'activité ribonucléase de la toxine VapC7	148
C. Electrophorèse des protéines et Western blot	148

Figure 1: La rhizosphère et les interactions plantes-micro-organismes

Figure 2: Impact du microbiome présent dans la rhizosphère

Figure 3 : La contribution des ARN 16S des différents phylla bactériens présents dans les sols (analyse de 29020 clones issus de 21 banques)

Figure 4 : Les différentes étapes de la mise en place de la symbiose mycorhizienne

Figure 5 : Le cycle de l'azote dans les sols

Figure 6 : La nodosité racinaire de *Medicago truncatula*

Figure 7 : Les échanges énergétiques et les flux de molécules dans la symbiose fixatrice d'azote

Figure 8 : Arbre phylogénétique simplifié Des Légumineuses

Figure 9: Schéma représentant la phylogénie des protéobactéries

Figure 10 : La spécificité des principales interactions légumineuses – rhizobium

Figure 11 : Les facteurs Nod

Figure 12 : Schématisation des processus d'infection coordonnés régulés par des gènes symbiotiques

Figure 13 : Schématisation de l'infection des rhizobium dans les poils absorbants de la racine de légumineuse et de la pénétration dans la cellule végétale

Figure 14 : Représentation schématique de nodosités de type déterminé et indéterminé

Figure 15 : La différenciation des bactéries en bactéroïde

Figure 16 : La protéine BacA de *S. meliloti* semble essentielle. La protection contre l'effet toxique des peptides NCR

Figure 17 : Fixation d'azote et énergie métabolique

Figure 18 : Analyse histologique de la mise en place de la sénescence nodositaire

Figure 19 : Schéma représentant l'implication des EAO (Espèces Actives de l'Oxygène) et du NO (Monoxyde d'azote) dans les différentes étapes de la symbiose

Figure 20 : Profil d'expression des gènes *rboh* dans la nodosité de *M. truncatula*

Figure 21 : Signalisation impliquant la leghémoglobine (lb) et la formation d'EAO

Figure 22 Analyse de cDNA-AFLP sur nodosité de *M. truncatula*

Figure 23 : Les systèmes toxine antitoxine

Figure 24 : Les TA plasmidiques et leur rôle dans la ségrégation des plasmides (module d'addiction)

Tableau 1: La diversité des TA plasmidiques

Figure 25 : L'organisation génétique des systèmes TA de type I et III

Figure 26 : L'organisation génétique des systèmes de type II et V

Tableau 2 : Les différentes superfamilles des systèmes de type II à deux composants

Figure 27 : L'organisation génétique des systèmes de type IV

Figure 28 : Les différentes cibles des toxines des systèmes TA

Figure 29 : Le système TA PezAT de *Streptococcus pneumoniae*

Figure 30 : Rôle des toxines sur la réplication de l'ADN : ADN gyrase ciblée

Figure 31 : La toxine VapC5 de *Mycobacterium tuberculosis* : structure et activité RNase

Figure 32 : Les ARN cibles moléculaires des toxines

Figure 33 : Régulation de l'expression des systèmes TA de type II

Figure 34 : Les différentes familles d'antitoxines basées sur leurs structures 3D

Figure 35 : Le complexe TA RelBE : un modèle de coopérativité conditionnelle pour la fixation à l'ADN

Figure 36 : Schéma du cycle infectieux de *Mycobacterium tuberculosis*

Figure 37 : Le système TA de type TAC

Figure 38 : La mort cellulaire programmée chez les bactéries

Figure 39 : La mort cellulaire programmée (PCD) par le système MazEF

Figure 40 : La persistance bactérienne

Figure 41 : Rôle de la toxine HipA dans la persistance

Tableau 3 : Systèmes Toxine Antitoxine chromosomiques de type II de *S. meliloti*

Tableau 4: Systèmes Toxine Antitoxine plasmidiques de type II de *S. meliloti*

Tableau 5 : Environnement génétique des systèmes VapBC chromosomiques de *S. meliloti*.

Figure 42 : Profil d'expression de trois ARNnc et des gènes proches de ces ADNc de *S. meliloti* dans les différentes zones de la nodosité

Figure 43 : Alignement des séquences protéiques des toxines VapC de *S. meliloti*

Figure 44 : Structures tridimensionnelles prédites de toxines VapC de *S. meliloti*.

Tableau 6 : Comparaison de la structure tridimensionnelle prédite des VapC de *S. meliloti* à celles des toxines VapC de *Shigella flexneri* et VapC5 de *Mycobacterium tuberculosis*.

Figure 45 : Arbre phylogénétique des toxines VapC de *S. meliloti*

Figure 46 : Alignement des séquences protéiques des antitoxines VapB à domaine AbrB-like de *S. meliloti*.

Figure 47 : Alignement des séquences protéiques des antitoxines VapB à domaine PHD et RHH de *S. meliloti*.

Tableau 7 : Tableau récapitulatif des tests de toxicité des toxines VapC chez *E. coli*

Figure 48 : Exemple de test de viabilité réalisé chez *E. coli* par surexpression de la toxine VapC9

Figure 49 : Profil d'expression des 11 toxines vapC de *S. meliloti* au cours de la croissance bactérienne (étude *in silico*).

Figure 50 : Zones structurales de la nodosité fonctionnelle (15 jours post inoculation) de *M. truncatula* découpées par microdissection laser (B. Roux et al. 2014).

Figure 51 : Profil d'expression des gènes *vapBC* de *S. meliloti* dans la nodosité

Figure 52 : Construction de mutants stables d'inactivation de la toxine

Figure 53 : Courbes de croissance des mutants d'inactivation de la toxine VapC (*vapC*-) et de la souche sauvage (WT2011)

Tableau 8 : Caractéristiques physiologiques et capacité fixatrice d'azote de *Medicago truncatula* en symbiose avec les mutants d'inactivation des toxines VapC de *S. meliloti*

Figure 54 : Caractéristiques physiologiques des plantes et nodosités de *M. truncatula* inoculés avec le mutant *vapC10* de *S. meliloti*

Figure 55 : Effet d'un stress salin sur la capacité fixatrice d'azote

Figure 56 : Représentation schématique du rôle du module VapBC5 de *S. meliloti* dans un contexte WT, *vapB5* et *vapC5*

Figure 57. Modèle proposé pour le rôle de la RNase VapC7 in planta dans un contexte sauvage WT

Figure 58 : Modèle proposé concernant les cibles putatives des toxines VapC de *S. meliloti* dans la souche WT au cours de l'interaction symbiotique

Figure 59 : Schématisation du profil d'expression des gènes *vapC7* et *vapB7* dans les différentes zones de la nodosité WT

Figure 60 : Deux systèmes TA dans le génome de *Candidatus gigaspora margarita*

INTRODUCTION PARTIE 1 :

LES INTERACTIONS PLANTES – MICRO-ORGANISMES

LA SYMBIOSE LEGUMINEUSE-RHIZOBIUM

I. La rhizosphère et les interactions plantes – micro-organismes :

A. La rhizosphère

Les interactions entre : les racines des plantes et la microflore des sols résultent dans le développement d'un environnement dynamique appelé la rhizosphère. Dans cette zone, les communautés microbiennes se nourrissent de composés et de débris issus des cellules végétales mortes (**Figure 1**). La variété génétique et fonctionnelle de la population microbienne ou microflore du sol, a un impact sur la fonction des sols. De nombreux micro-organismes telluriques sont responsables de processus environnementaux clefs comme par exemple, les cycles biogéochimiques du carbone ou de l'azote. Ces micro-organismes contribuent à la bonne santé des sols et des plantes en établissant des interactions complexes avec ces dernières (Barea et al., 2005).

La rhizosphère est considérée comme l'un des écosystèmes les plus complexes présents sur terre. Les facteurs biotiques qui affectent la structure de cette communauté sont les espèces de plantes et les cultivars, les étapes de développement des plantes et leur santé. Les facteurs abiotiques comme le climat, la géographie, le type de sol, ainsi que les apports dus aux activités humaines (fongicides, pesticides, herbicides) modulent également la structure de cette communauté microbienne. Les plantes peuvent contrôler les interactions avec les micro-organismes via leurs exsudats racinaires qui peuvent constituer des signaux moléculaires ou des nutriments. Les exsudats incluent les ions, l'oxygène, l'eau et des composés carbonés. La quantité de carbone sécrété par les racines varie, mais peut atteindre jusqu'à 25% du carbone fixé par la plante. Les plantes peuvent récupérer, comme bénéfice des interactions microbiennes, un apport en nutriments et micronutriments mais également une meilleure défense aux stress abiotiques. Les micro-organismes composant la rhizosphère protègent également les

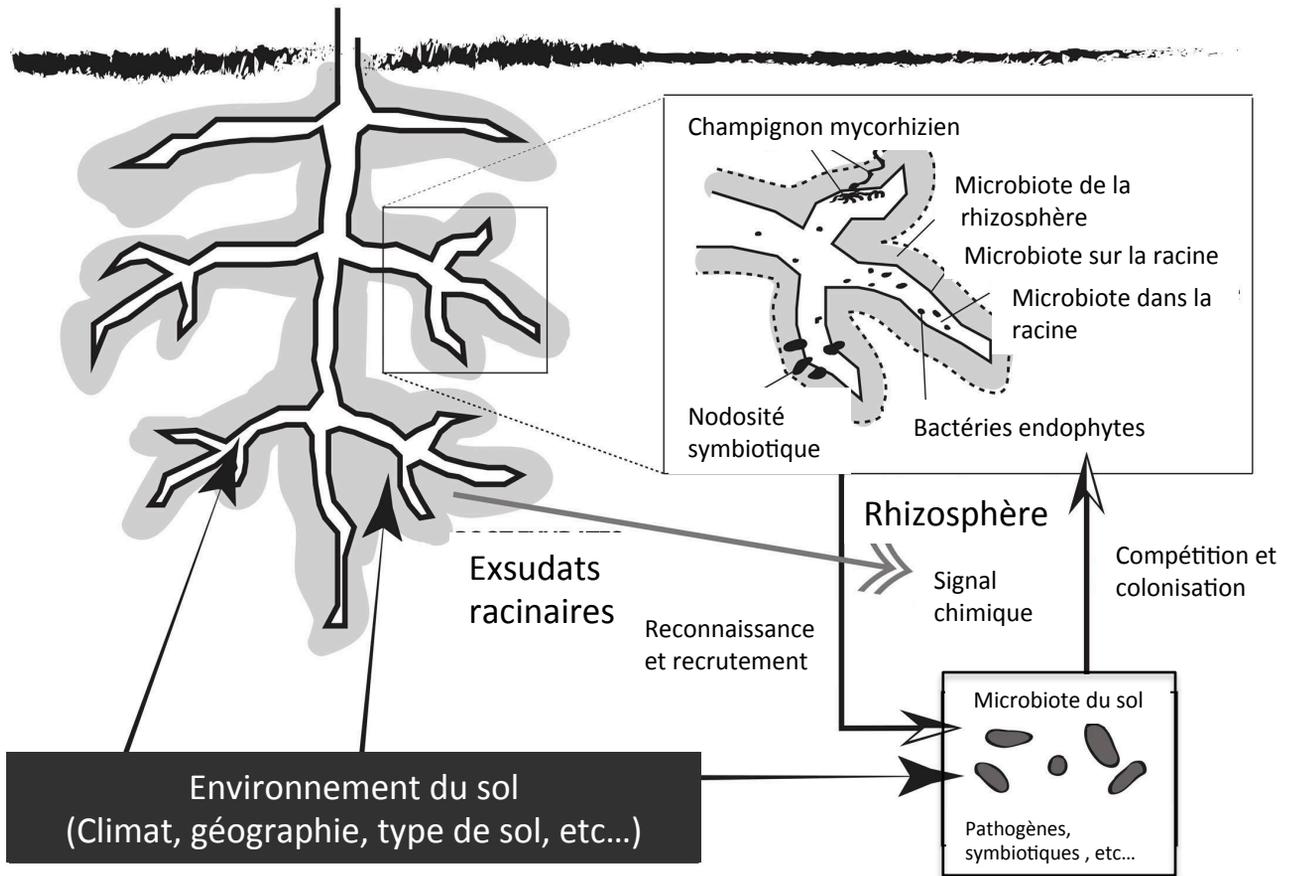


Figure 1 : La rhizosphère et les interactions plantes-micro-organismes

Le sol exerce un effet direct sur la plante, en fonction de sa qualité physico-chimique mais aussi de la communauté microbienne présente autour des racines dans une zone appelée la rhizosphère. Les exsudats racinaires de la plante constituent des signaux moléculaires qui peuvent être perçus par les bactéries du sol. La reconnaissance de ces signaux entraîne un recrutement des rhizobiotes. Le micro-environnement dans la rhizosphère inclut le microbiome autour de la racine (<3-5mm de la racine), le microbiome à la surface des racines et à l'intérieur de celles-ci.

plantes de certains pathogènes comme *Fusarium*, *Gaeumannomyces*, *Rhizoctania*, *Phytophthora* et *Phytophthora* (Coats and Rumpho, 2014).

D'autre part, de nombreuses interactions plantes - micro-organismes peuvent avoir des effets bénéfiques importants sur la germination et la vigueur des graines, la croissance et le développement des plantes, la nutrition, et le rendement végétal (**Figure 2**). Les micro-organismes peuvent cependant avoir également un effet néfaste sur les plantes, en causant des maladies, c'est le cas des micro-organismes pathogènes (Mendes et al., 2013) (**Figure 2**).

Par conséquent, la connaissance du microbiote autour de plantes d'intérêt agronomique est importante pour étudier la santé des plantes et augmenter les rendements végétaux. Le microbiote présent dans les sols cultivés est bien plus important que celui présent dans le sol en général. Ainsi, dans un gramme de sol de forêt, on estime qu'il existe $4 \cdot 10^7$ cellules procaryotes, alors qu'un gramme de sol d'une surface cultivée contiendrait $2 \cdot 10^9$ cellules procaryotes (Torsvik and òvreas, 2002). Il a été démontré que les espèces à croissance rapide et opportunistes comme les espèces de *Pseudomonas* dominant la rhizosphère (Berendsen et al., 2012).

La mise en culture et l'isolement de micro-organismes est une méthode traditionnelle pour déterminer la diversité des micro-organismes présents dans un milieu. Cependant seul 0,1 à 1% des bactéries présentes dans le sol est cultivable, aussi d'autres méthodes ont dû être développées. Des approches moléculaires basées sur l'isolement de séquences d'ADN microbien à partir d'échantillons de sol et l'amplification par PCR de cet ADN ont été mis en place. De façon théorique, l'ADN microbien isolé d'un échantillon de sol est représentant de l'ADN collectif de tous les micro-organismes de ce sol. Il est appelé Métagénome (Daniel, 2005).

Des analyses phylogénétiques peuvent également être réalisées par amplification PCR et séquençage des gènes d'ARNr 16S de l'ADN du sol, en utilisant des amorces universelles pour les bactéries et les archées (Janssen, 2006) (**Figure 3**). Ces analyses permettent de cataloguer et de comparer la diversité microbienne dans des habitats différents tant au niveau géologique que biologique (Daniel, 2005). Pour exemple, une méta-analyse de banques issues de la rhizosphère de 14 espèces de plantes différentes, révèle la présence de plus de 1200 taxons bactériens distincts, appartenant à 35 ordres différents ; celui des *Protéobacteria* étant le phylum dominant (Mendes et al., 2013).

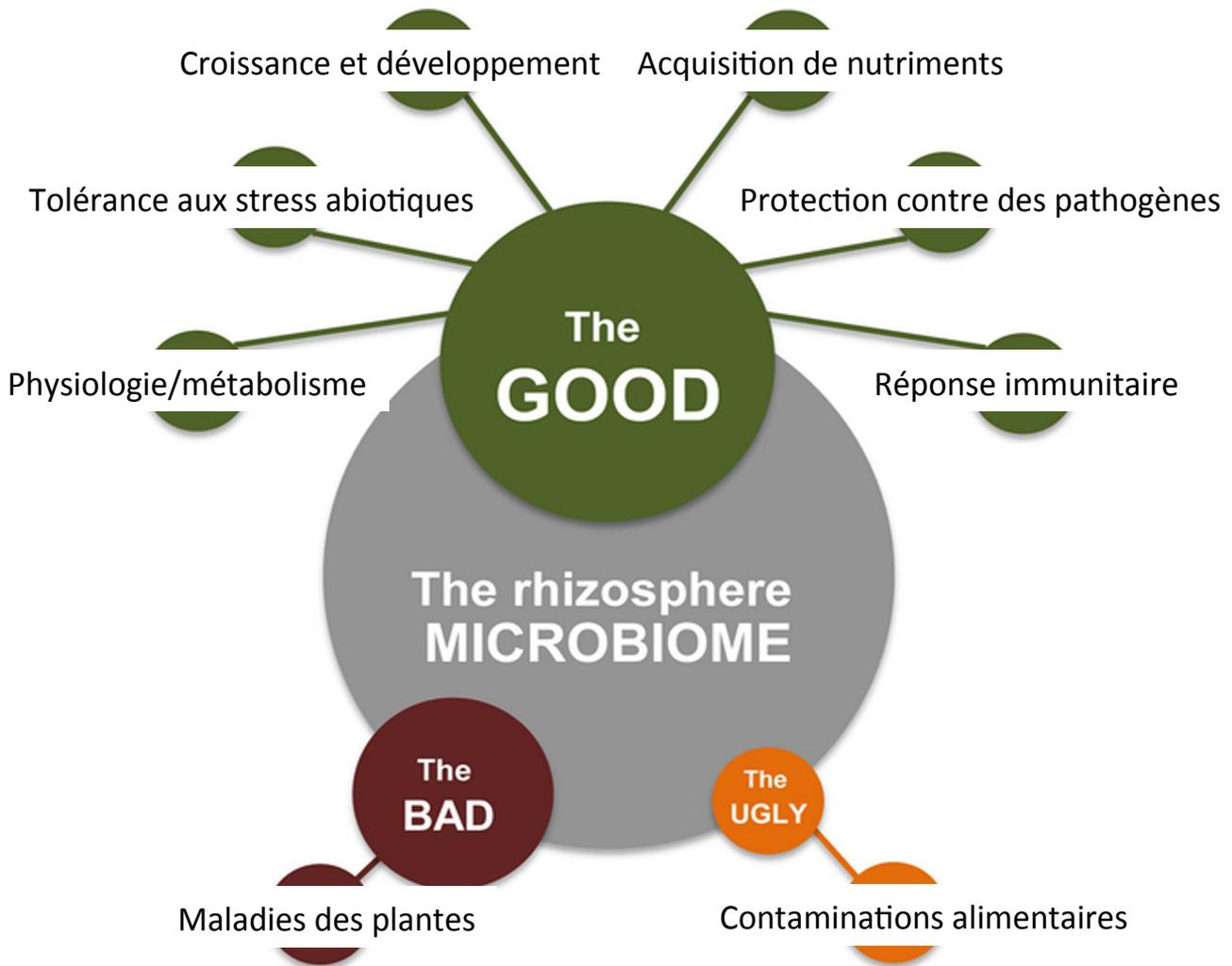


Figure 2 : Impact du microbiome présent dans la rhizosphère

Schéma représentant l'impact du microbiome (ensemble des gènes du microbiote) sur la plante, lié à la diversité des interactions plantes-micro-organismes dans la rhizosphère. « The Good » représente les interactions bénéfiques pour les plantes, « The Bad », les interactions pathogènes et « The Ugly », les bactéries pathogènes de l'homme présentes à la surface des plantes.

B. La variété des interactions plantes-micro organismes

Les micro-organismes associés à des plantes ont été classés en mutualistes, parasites ou pathogènes. Alors que la relation mutualiste entraîne un bénéfice pour les deux partenaires, le microbe reçoit certains bénéfices de son hôte au détriment de celui-ci dans le parasitisme. Les parasites colonisent leurs hôtes et puisent dans leurs ressources causant des dommages décrits comme collatéraux dus à leur présence physique. Au contraire, les pathogènes peuvent activement causer des dommages sur la plante pour leur propre intérêt trophique, provoquant fréquemment des nécroses par exemple (Newton et al., 2010).

1. Les interactions de type pathogènes :

Les plantes possèdent des mécanismes de défense leur permettant de se protéger contre des invasions microbiennes, et sont donc, la plupart du temps, résistantes à l'attaque de pathogènes. Les plantes ont ainsi développé deux stratégies permettant de détecter des organismes pathogènes. La première repose sur la présence de récepteurs protéiques, appelés récepteurs de reconnaissance de motif (PRR), qui reconnaissent, à la surface externe de la cellule, des molécules élicitrices microbiennes conservées appelées « pathogen associated molecular patterns » (PAMP). Les PAMP sont typiquement des composants essentiels comme la flagelline bactérienne ou la chitine présente chez les champignons. Cette reconnaissance des PAMPs entraîne une réponse immunitaire induite (PTI pour PAMP Triggered Immunity). La seconde stratégie implique la reconnaissance, par des récepteurs intracellulaires, des molécules effectrices injectées par le pathogène. Cette reconnaissance induit une immunité effectrice déclenchée (ETI pour Effector Triggered Immunity) (Dodds and Rathjen, 2010). Cette ETI conduit à la mise en place de la réponse hypersensible de la plante et se caractérise par une mort cellulaire au niveau de la partie infectée par le pathogène, ce qui limite sa propagation dans la plante. Cependant, certains micro-organismes se sont adaptés pour contourner les mécanismes de défense des plantes et ainsi accéder aux nutriments qu'elles contiennent. Cela inclut la destruction des cellules végétales pour se nourrir de leur contenu (parasites nécrotrophes), la croissance entre les cellules végétales pour puiser les nutriments de l'apoplaste (parasites endophytes), la fusion des vascularisations de l'hôte et de celles du parasite et l'induction de cellules géantes

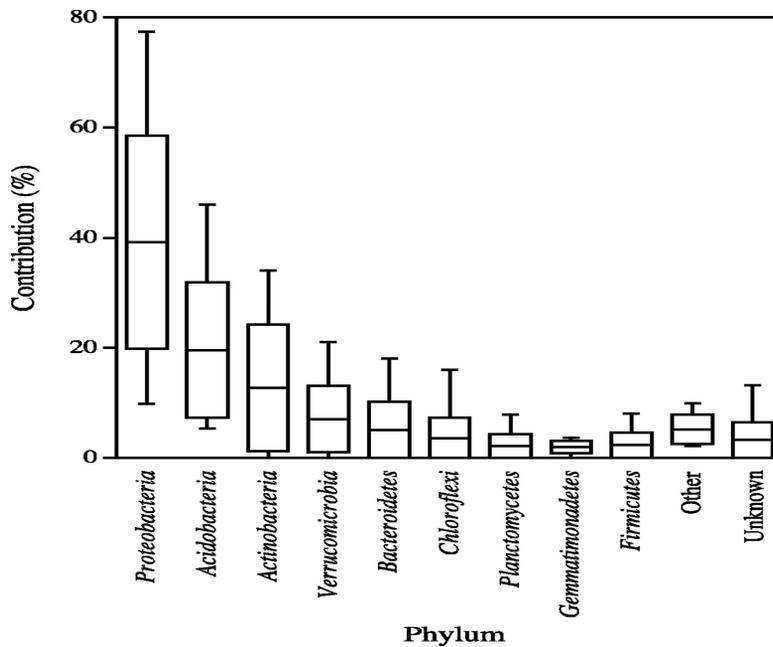


Figure 3 : La contribution des ARN 16S des différents phylla bactériens présents dans les sols (analyse de 29020 clones issus de 21 banques)

Les limites des rectangles représentent la déviation standard de part et d'autre de la moyenne (droite au centre du rectangle). La ligne verticale de part et d'autre du rectangle, indique le minimum et le maximum de contribution de chaque phylum.

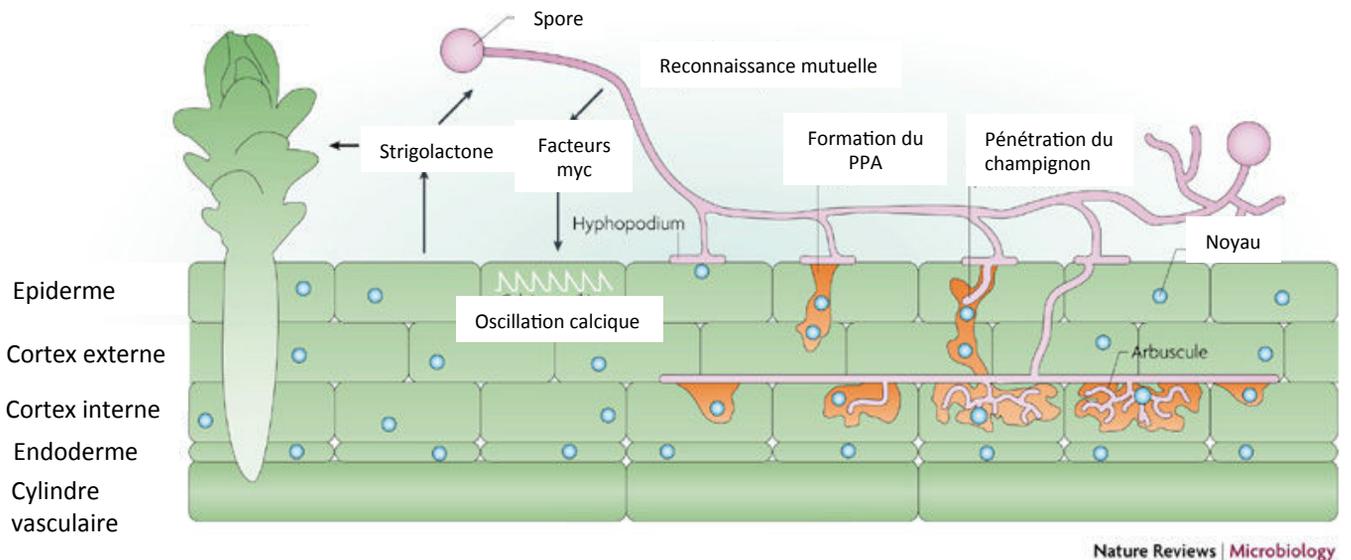
(nématodes à galles) et la colonisation intracellulaire de cellules vivantes (parasites biotrophes). La plupart de ces modes d'infection requièrent un dialogue moléculaire entre les deux partenaires, permettant de mener à une relation compatible et de conduire à l'établissement d'une interaction (Paszkowski, 2006).

2. Interactions de type symbiotiques : La symbiose mycorrhizienne

La symbiose qualifie toute interaction durable associant, pendant au moins une partie du cycle biologique, deux ou plusieurs organismes spécifiquement distincts. Bien qu'à l'origine ce terme, introduit par le botaniste allemand Anton de Bary au milieu du XIX^{ème} siècle, ait été utilisé pour décrire une relation qui unit, au sein d'un lichen, un champignon et une algue, il englobe aujourd'hui tous les cas d'associations durables à bénéfices mutuels, du plus simple au plus complexe. On définit différents types de symbioses selon la localisation du symbiote vis-à-vis de l'hôte : il y a ectosymbiose lorsque le symbiote vit à la surface de l'hôte, endosymbiose lorsque le symbiote vit à l'intérieur de l'hôte sans toutefois pénétrer à l'intérieur des cellules, et endocytobiose ou symbiose intracellulaire, quand le symbiote vit dans le cytoplasme des cellules de l'hôte.

Parmi les différentes symbioses plantes - micro-organismes décrites, la symbiose mycorrhizienne est la plus ancienne interaction à être apparue. Les mycorhizes arbusculaires (AM) sont des champignons biotrophes obligatoires qui colonisent plus de 80% des plantes terrestres. C'est donc l'une des interactions plantes - micro-organismes les plus répandues (Remy et al., 1994). Les AM fournissent à la plante des composés phosphatés inorganiques et en échange celle-ci fournit au champignon des composés carbonés issus de la photosynthèse. Le phosphore est un élément essentiel à la croissance des plantes. Cependant il est souvent limitant dans les sols et l'application d'engrais enrichis en phosphate est essentielle pour obtenir des rendements végétaux conséquents dans le cas de cultures d'intérêt agronomique. Récemment, il a été suggéré que les plantes recevaient tout leur phosphore inorganique via les AM (Smith et al., 2011).

Cette symbiose passe par la mise en place d'un dialogue moléculaire : la détection de signaux de l'hôte induit un branchement de l'hyphe, ce « branching factor » a été déterminé comme étant le strigolactone. Les plantes excrètent de façon constitutive des strigolactones mais leurs concentrations est plus élevée dans les exsudats de plantes hôtes d'AM ainsi que dans les plantes carencées en phosphate. Dans ce dialogue



Nature Reviews | Microbiology

Figure 4 : Les différentes étapes de la mise en place de la symbiose mycorhyzienne

Les strigolactones produites par les plantes entraînent la germination de la spore du champignon AM et le développement d'hyphes. Des facteurs Myc sont alors produits par l'AM, induisant un signal calcique dans les cellules de l'épiderme racinaire et activant des gènes symbiotiques. En réponse à des composés chimiques et à une stimulation mécanique, les cellules de plantes produisent un appareil de pré-pénétration (PPA) permettant à l'hyphes de traverser les couches cellulaires externes de la racine pour atteindre les cellules du cortex où il se ramifie en branchements appelés Arbuscules.

Adapté de : M. Parniske *et al.*, 2008

moléculaire, le champignon produit des facteurs Myc. Ces molécules diffusibles induisent la transcription chez la plante de gènes symbiotiques. Une signalisation commune de ces premières étapes avec la symbiose Rhizobium-légumineuse a pu être mise en évidence mais certains éléments de la signalisation mycorhizienne restent encore inconnus (Oldroyd et al., 2009) (**Figure 4**). Du fait de son apparition il y a 400 000 000 d'années, la symbiose AM pourrait être à l'origine de la symbiose fixatrice d'azote entre les rhizobia et les légumineuses qui auraient utilisé des voies de signalisations existantes (Gherbi et al., 2008).

Enfin, la présence de bactéries associées au champignon mycorhizien a également été décrite (Bonfante and Anca, 2009). Il s'agit de bactéries extracellulaires, présentes à la surface de l'hyphe extraradical et dont la communauté inclut plusieurs taxons bactériens avec une prédominance d'espèces du genre *Pseudomonas*, *Burkholderia*, et *Bacillus*. Dans certains cas, des bactéries intracellulaires présentes dans le cytoplasme de champignon AM (*Glomus calidonium*, *Acaulospora laevis*, *Gigaspora margarita*) ont également été décrites. Il y aurait donc un troisième partenaire de type bactérien dans la symbiose mycorhizienne. L'étude de ces bactéries endosymbiotiques reste complexe du fait qu'elles ne soient pas cultivables. L'utilisation combinée d'approches de microscopie et d'analyses moléculaires (ARN 16S), a toutefois permis d'identifier, chez différents membres d'AM de la famille des Gigasporaceae, des bactéries proches des *Burkholderia*. Du fait de leur incultivabilité par rapport aux *Burkholderia*, elles ont été placées dans un nouveau taxon appelé "Candidatus Glomeribacter gigasporarum" (Salvioli et al., 2008; Bonfante and Anca, 2009).

II. La symbiose fixatrice d'azote

L'azote (N) est le plus important des éléments minéraux dont les plantes ont besoin, pour la synthèse des protéines, des nucléotides, des acides nucléiques et de la chlorophylle. L'azote stimule le développement et l'activité racinaire, favorisant ainsi l'absorption des autres éléments minéraux et la croissance des plantes. Il est essentiel pour la synthèse des enzymes de la photosynthèse.

La première source d'azote utilisée par les plantes est l'azote du sol. Les plantes absorbent l'azote sous forme de nitrate (NO_3^-) et d'ammonium (NH_4^+) (**Figure 5**).

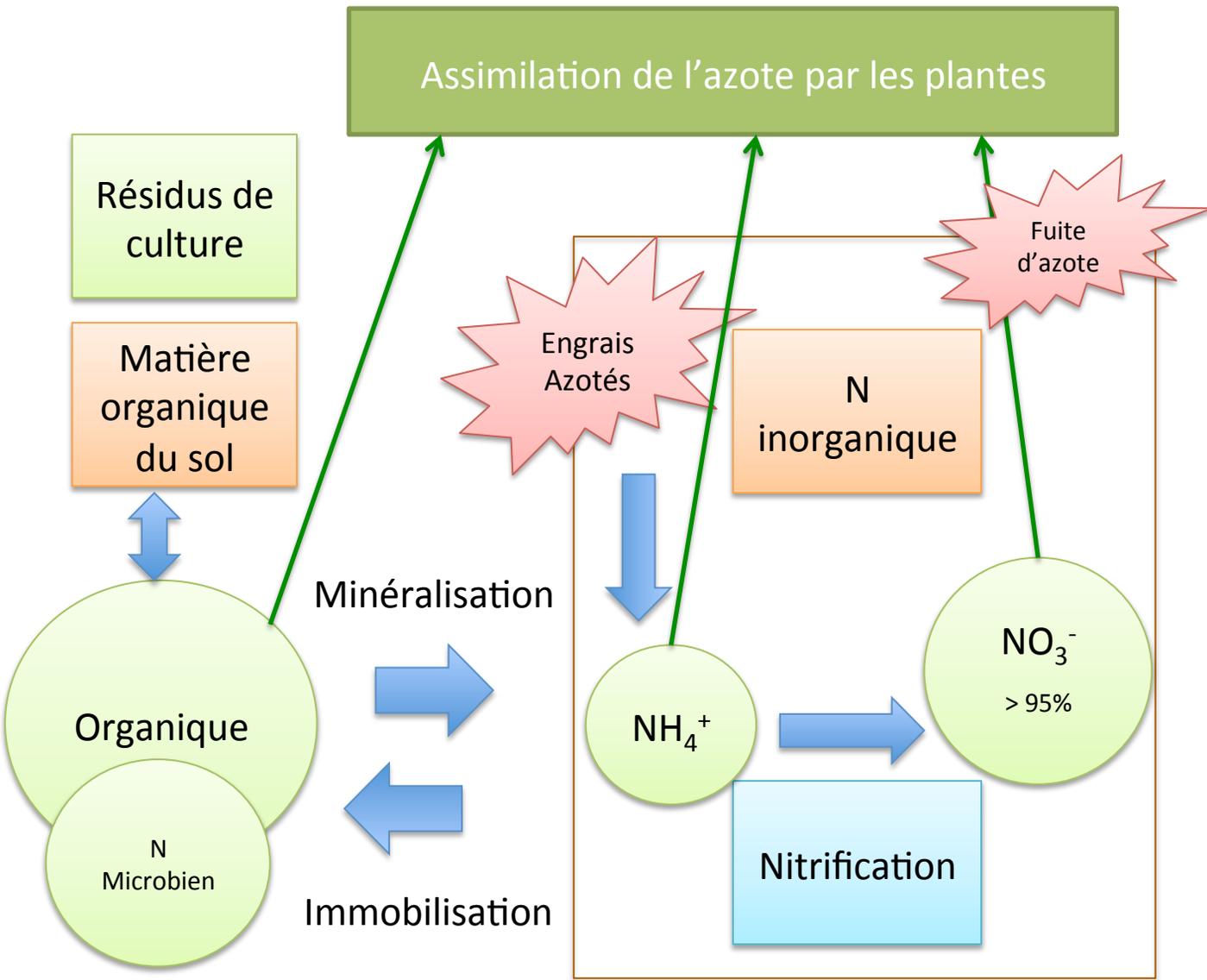


Figure 5 : Le cycle de l'azote dans les sols

Le cycle de l'azote dans un système agricole classique est dominé par le système de nitrification qui génère plus de 95% de l'azote sous forme de nitrate NO₃⁻. C'est la principale forme d'azote inorganique disponible pour l'absorption et l'assimilation par les plantes.

Adapté de : Subbarao *et al.*, 2012

L'importance relative de chacune de ces formes dépend de l'espèce végétale et des conditions du milieu. En l'absence de tout apport d'engrais, les plantes non fixatrices d'azote utilisent l'azote du sol durant l'intégralité de leur cycle physiologique, alors que les plantes fixant l'azote atmosphérique, suite à la mise en place d'une symbiose bactérienne, utilisent l'azote du sol uniquement durant la première phase de la croissance. L'azote issu du sol et des amendements organiques ne suffisant pas pour atteindre des rendements optimaux, des engrais minéraux azotés sont utilisés pour augmenter la production végétale. De même, dans les cultures de légumineuses (plantes fixatrices d'azote via la symbiose), un ajout d'engrais azoté peut avoir lieu si cette symbiose n'est pas assez efficace.

Les quantités d'azote fixé sont très variables d'une espèce à l'autre, ainsi que pour une espèce donnée, car l'activité symbiotique est influencée par les souches bactériennes, l'espèce végétale et les facteurs du milieu (Wani et al., 1995). On estime actuellement que, au niveau de l'agriculture mondiale, 46 Mt d'azote proviennent de la fixation symbiotique par les légumineuses, alors que 87 Mt d'engrais azotés sont utilisés par ailleurs. Les coûts de fabrication des engrais chimiques, azotés et phosphorés notamment, sont en constante augmentation car ils dépendent essentiellement de l'exploitation de ressources non renouvelables (pétrole et roches phosphatées) en voie de raréfaction. Cette situation a une forte incidence sur les coûts de production agricole et sur la disponibilité de ces engrais dans les futurs systèmes de culture. De plus, les ions nitrates en solution et peu retenus par les colloïdes du sol, peuvent être facilement perdus par lessivage et polluer les eaux souterraines. En accord avec ces constats économiques et écologiques, les plans de type Ecophyto 2018 (reconduit à 2022) visent à diminuer de moitié l'apport d'engrais dans les cultures. Dans ce contexte, la culture des légumineuses, en association ou en rotation avec des plantes d'intérêt agronomique non fixatrice d'azote, représente une alternative intéressante pour enrichir les sols en azote de façon non polluante.

Il y a donc un fort intérêt à étudier d'un point de vue fondamental la symbiose fixatrice d'azote, notamment en connaissant mieux le rôle des deux partenaires de cette interaction, avec la finalité de disposer d'un couple fixateur plus performant et plus résistant aux conditions environnementales délétères.



Figure 6 : La nodosité racinaire de *Medicago truncatula*

Photographie de nodosités fonctionnelles sur des racines de *Medicago truncatula* en culture *in vitro*, trois semaines post-inoculation avec *Sinorhizobium meliloti*. La barre : 3mm.

A. Les bactéries fixatrices d'azote symbiotiques et non symbiotiques

Dans la nature, aucun organisme du règne animal ou végétal ne possède les propriétés requises pour métaboliser l'azote atmosphérique en azote ammoniacal ou ammoniac (NH_3). Les seuls organismes vivants qui en sont capables sont des procaryotes appartenant au règne des bactéries et des archées. Leur aptitude à transformer l'azote moléculaire (N_2), très stable, en une forme directement assimilable, provient d'un complexe enzymatique appelé nitrogénase. Ce complexe enzymatique catalyse la réduction de l'azote en NH_3 , généralement en condition de microaérobie. Les bactéries fixatrices d'azote, plus communément appelées diazotrophes, sont retrouvées à l'état libre dans le sol, ou alors en symbiose avec des organismes eucaryotes qui sont en général des plantes.

Certaines cyanobactéries fixatrices d'azote s'associent à des végétaux. Ainsi, les thalles des bryophytes possèdent des cavités remplies de cyanobactéries du genre *Nostoc*. De même, des fougères flottantes du genre *Azolla* abritent des bactéries du genre *Anabeana* au sein de cryptes situées sur leurs feuilles. Ces bactéries peuvent également s'associer avec des préspermaphytes, comme les Cycas dont les racines comportent des *Anabeana* intercellulaires au niveau du parenchyme cortical. Il existe également avec des angiospermes du genre *Gunnera* (Meeks and Elhai, 2002).

Certaines bactéries filamenteuses à Gram positif du groupe des actinomycètes sont également été décrites comme diazotrophes. Elles forment alors des actinorhizes, nodosités ramifiées centimétriques sur les racines de différentes dicotylédones, dont l'Aulne (*Alnus*) et les Argousiers (*Hippophae*). Il s'agit d'endocytobiose car les bactéries pénètrent dans les cellules du cortex racinaire (Pawlowski and Demchenko, 2012). Les rhizobiacées (du genre *Rhizobium*, *Bradirhizobium* et *Azorhizobium*...) forment également des endocytobioses dans les nodosités des légumineuses.

B. Les partenaires de la symbiose rhizobium- légumineuses

La symbiose entre des bactéries du sol du genre *Rhizobium* (Gram négatif, aérobies), appartenant à la famille des *Rhizobiaceae*, et les plantes de la famille des légumineuses

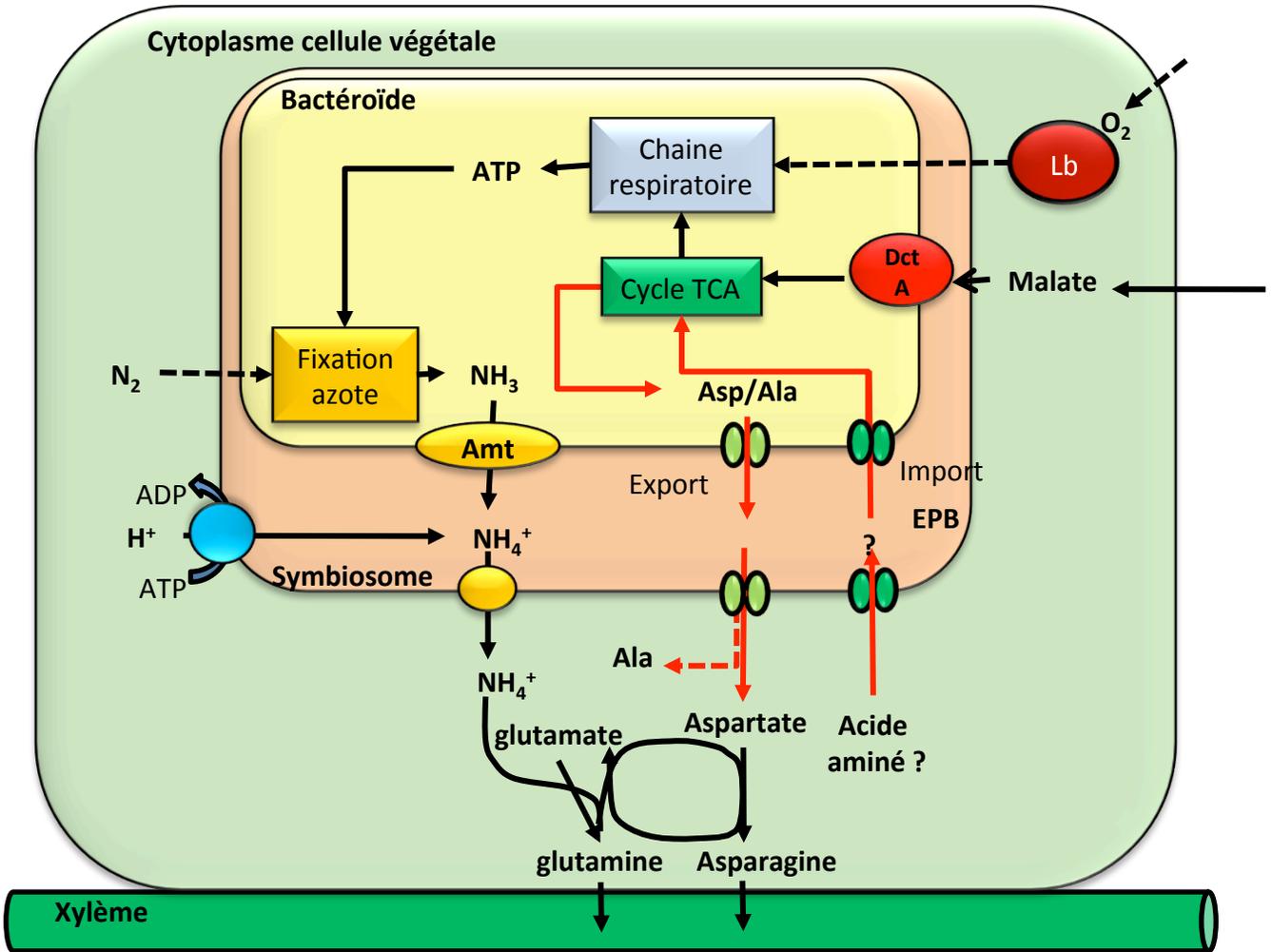


Figure 7 : Les échanges énergétiques et les flux de molécules dans la symbiose fixatrice d'azote

Schéma représentant les échanges de composés carbonés et azotés lors de la symbiose avec le pois. Les flèches en rouge symbolisent les échanges d'acides aminés entre le bactéroïde et la cellule végétale. Le compartiment en jaune représente le bactéroïde, présent dans une vacuole d'origine végétale (orange) et l'ensemble forme le symbiosome.

Lb: Léghémoglobine, DctA: transporteur d'acide dicarboxylique situé sur la membrane plasmique du bactéroïde, Amt: transporteur d'ammonium, EPB: espace pér bactéroïdien.

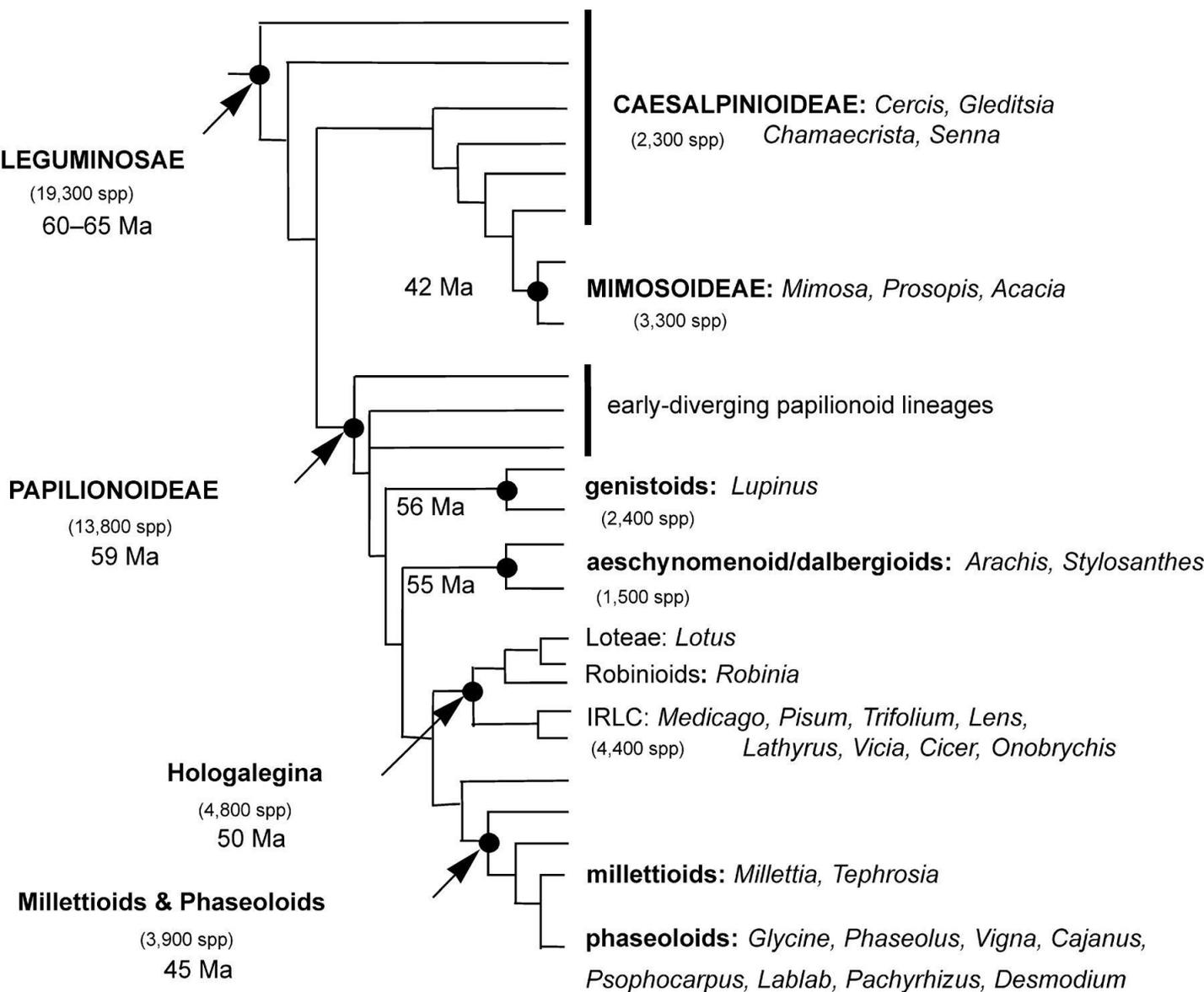


Figure 8 : Arbre phylogénétique simplifié des Légumineuses

Arbre phylogénétique modifié de Doyle and Luckow 2003. Les trois sous-familles (Caesalpinioideae, Mimosoideae et Papillionoideae) et les sous-clades majeurs identifiés par des études de phylogénies moléculaires récentes sont visibles en caractères gras (Kajita *et al.*, 2001; Wojciechowski *et al.*, 2004) et leurs positions sont indiquées par un cercle noire (Estimation du nombre de Taxas et de l'âge en millions d'années issus de Lewis *et al.*, 2005, et Lavin *et al.*, 2005).

Adapté de : P. Gepts *et al.*, 2005

(Fabacées), conduit à la formation d'un nouvel organe, la nodosité (**Figure 6**). Ce nouvel organe contient les bactéries dans un environnement favorable à l'activité de la nitrogénase, ce qui leur permet de fixer l'azote atmosphérique et de le restituer à la plante sous forme d'ammonium. En échange, la légumineuse, via sa capacité à réaliser la photosynthèse, fournit à la bactérie de l'énergie via des composés carbonés ainsi qu'une niche écologique favorable (**Figure 7**).

1. Les légumineuses

La famille des Légumineuses (ou Fabacées) est une famille de plantes dicotylédones, qui englobe 430 genres et plus de 18000 espèces, divisée en trois sous-familles : les Mimosoideae, les Caesalpinioideae et les Papilionoideae (**Figure 8**). Elles ont une grande importance économique car leurs graines ou leurs foins sont une source de protéines végétales pour l'alimentation animale ou humaine et car elles ne nécessitent pas ou peu d'engrais azotés. Les Papilionoideae contiennent les espèces qui présentent le plus fort intérêt agronomique. Au sein de ce clade, on trouve différents sous-clades comme les genistoides (avec le lupin *Lupinus angustifolius*) et les dalbergioides (avec les arachides *Arachis hypogaea*). La majorité des espèces d'intérêt agronomique se retrouve dans le sous clade des galégoïdes (pois chiche, pois, fève, haricot, lentille, luzerne) ou des phaseloides (Soja) (**Figure 8**).

La luzerne est la principale espèce de légumineuse fourragère en culture monospécifique au niveau mondial car très utilisée comme plante prairiale et fourragère pour l'alimentation du bétail. La récolte annuelle mondiale est de 454 millions de tonnes environ (Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture 2002). Pour les légumineuses à graines, le soja représente les $\frac{3}{4}$ de la production mondiale (essentiellement Brésil, Etats-Unis et Argentine) mais est minoritaire en France et en Europe. Certaines espèces de légumineuses sont également une source de matières grasses et de bois, ou présentent un intérêt en tant que plantes ornementales. Chaque sous-famille de Leguminosae regroupe en proportion très variable des genres pouvant développer des symbioses avec des bactéries du sol de la famille des rhizobiacées et des genres qui en sont incapables. Ainsi, plus de 90% des papilionoideae et des mimosacées peuvent établir une symbiose alors que seulement 25% des césalpinées en sont capables.

Les premières légumineuses modèles dont le génome a été séquencé sont *Medicago truncatula* (Young et al., 2011) et *Lotus japonicus* (Sato et al., 2008). Pour ces deux espèces facilement cultivables en chambres de culture, des outils et ressources

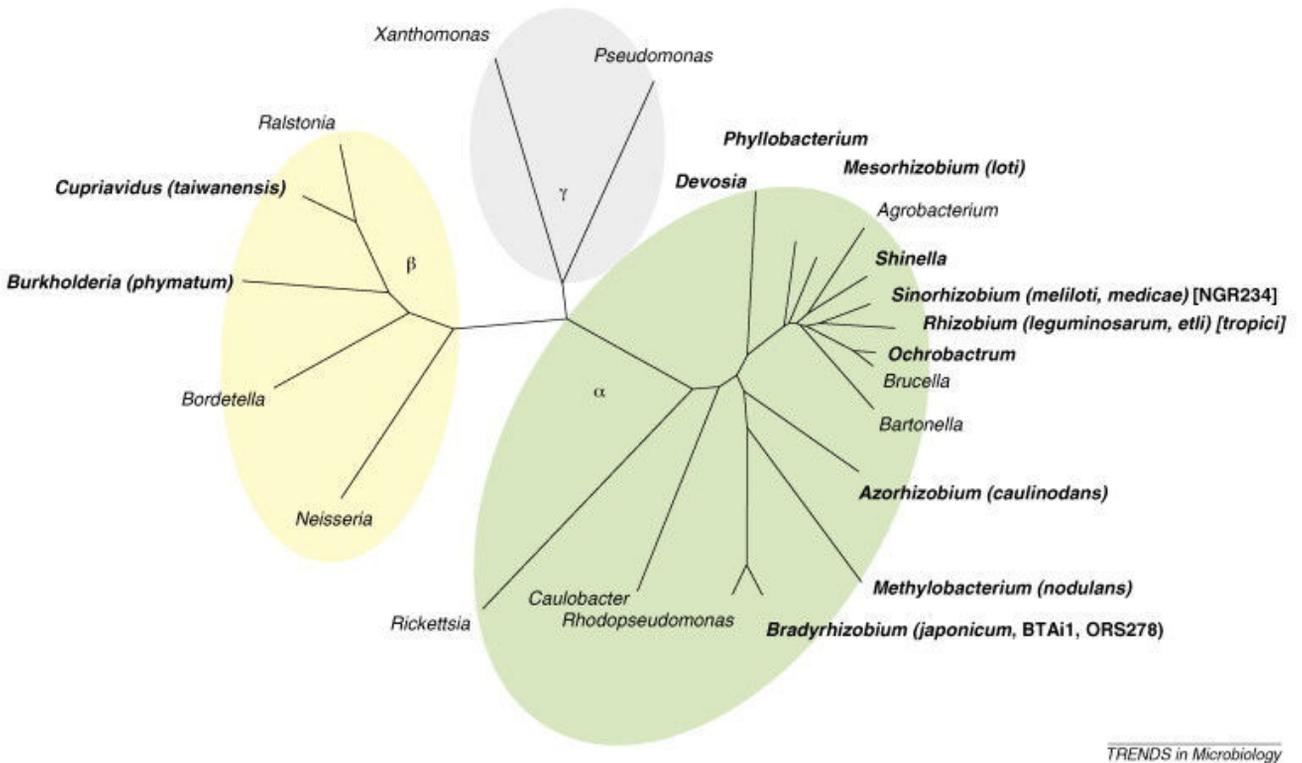


Figure 9 : Schéma représentant la phylogénie des protéobactéries

Les rhizobia sont marquées en gras. Les espèces de rhizobia dont les génomes sont séquencés sont indiquées entre parenthèses.

Extrait de : Masson-Boivin C. *et al.*, 2009

permettant de réaliser des approches moléculaires ont été développées (EST, librairie BAC, collections de mutants, etc). D'autres génomes de légumineuses sont maintenant disponibles (*Glycine max*, *Phaseolus vulgaris*, *Cicer arietinum*, *Cajanus cajan*) et d'autres projets de séquençage sont en cours.

2. Les rhizobia

Les bactéries qui forment des associations symbiotiques fixatrices d'azote avec des légumineuses sont réparties entre 44 espèces et 12 genres différents. Des analyses phylogénétiques basées sur l'analyse des séquences d'ARN 16S montrent qu'elles sont réparties entre les alpha et les bêta protéobactéries (Sawada et al., 2003) (**Figure 9**).

Le phylum des Protéobactéries, ou Proteobacteria, regroupe un grand nombre de bactéries à Gram négatif, phénotypiquement et physiologiquement très diverses. Les Protéobactéries ont été définies à partir des séquences d'ARN 16S et subdivisées en cinq sous-groupes appelés α , β , γ , δ et ϵ (Woese et al., 1984). Les α -protéobactéries ont des modes de vie variés et originaux. Elles sont capables, en particulier, d'établir des relations étroites avec les cellules eucaryotes. Ainsi, les α -protéobactéries regroupent des pathogènes d'animaux, intracellulaires obligatoires (*Rickettsia*, *Anaplasma*, *Cowdria*, *Ehrlichia*), ou facultatifs (*Brucella* et *Bartonella*), des symbiotes d'insectes, de cloportes ou de nématodes (*Wolbachia*), des pathogènes de végétaux (*Agrobacterium*), et des symbiotes de végétaux comme les Rhizobia (*Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium* et *Devosia*) ou comme les Methylobacteriaceae (*Methylobacterium nodulans*) (**Figure 9**).

Initialement, la classification des Rhizobia s'est basée sur l'étude des différents couples plantes-bactéries symbiotiques et de leurs spécificités d'hôtes (Willems, 2006). Parmi les Rhizobia, *Sinorhizobium meliloti* a été retenu comme un organisme modèle des fixateurs d'azote atmosphérique. Cette bactérie du sol est caractérisée par sa capacité à établir une symbiose avec des plantes des genres *Medicago* (*M. sativa* et *M. truncatula*), *Melilotus* et *Trigonella*. La symbiose rhizobium-légumineuse est, entre autre, caractérisée par sa spécificité d'hôte puisqu'une espèce donnée de rhizobium est généralement capable de noduler qu'un nombre limité de plantes hôtes (**Figure 10**).

Tout comme celui de *Mesorhizobium loti* (Kaneko et al., 2000 ; Laranjo et al., 2014), *Rhizobium etli* (Gonzalez et al., 2006), *Rhizobium leguminosarum* (Young et al., 2006) et *Bradyrhizobium japonicum* (Kaneko et al., 2000), le séquençage complet du génome de *S. meliloti* a été effectué. Le génome annoté de la souche Rm1021 puis plus

Genre	Espèce	Plante hôte	Référence
Rhizobium	<i>R. leguminosarum</i> bv. viciae	<i>Pisum sativum</i>	Laguerre <i>et al.</i> (1994)
	<i>R. leguminosarum</i> bv. trifolii	<i>Trifolium repens</i>	Laguerre <i>et al.</i> (1994)
	<i>R. leguminosarum</i> bv. phaseoli	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Laguerre <i>et al.</i> (1994)
	<i>R. tropicii</i> type IIA	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Laguerre <i>et al.</i> (1994)
	<i>R. tropicii</i> type IIB	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Vargas and Graham (1988)
	<i>R. etli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Laguerre <i>et al.</i> (1994)
	<i>R. galegae</i>	<i>Galega orientalis</i>	Lindström (1989)
Mesorhizobium	<i>M. loti</i>	<i>Lotus tenuis</i>	Laguerre <i>et al.</i> (1994)
	<i>M. huakuii</i>	<i>Astragalus sinicus</i>	Chen <i>et al.</i> (1991)
Sinorhizobium	<i>S. meliloti</i>	<i>Medicago sativa</i>	Bernard <i>et al.</i> (1986)
	<i>S. fredii</i>	<i>Glycine max</i>	Laguerre <i>et al.</i> (1994)
Bradyrhizobium	<i>B. japonicum</i>	<i>Glycine max</i>	Means <i>et al.</i> (1964)

Figure 10 : La spécificité des principales interactions légumineuses - rhizobium

récemment celui de la souche 2011 ont été mis à disposition de la communauté (Galibert et al., 2001; Sallet et al., 2013). *S. meliloti* est composé d'un génome tripartite d'environ 6,7 Mpb comprenant un chromosome de 3,65 Mpb (3341 gènes, porte les gènes de ménage), un Megaplasmide appelé pSymA de 1,35 Mpb (1293 gènes, porte les gènes de fixation de l'azote) (Barnett et al., 2001) et un autre Mégaplasmide appelé pSymB de 1,68 Mpb (1570 gènes, porte les gènes d'adaptation à l'environnement) (Finan et al., 2001). Cette organisation génétique est typique de nombreuses alpha-protéobactéries capables d'avoir un mode de vie libre dans le sol et de former des interactions symbiotiques avec des végétaux.

C. Mise en place, organogenèse des nodosités et fixation d'azote

1. Dialogue moléculaire et reconnaissance plante-bactérie

La découverte et la caractérisation de la structure des facteurs Nod a été une étape majeure dans la compréhension des voies de signalisation essentielles à la mise en place de la symbiose et à l'origine de la spécificité de reconnaissance bactérie-plante hôte. Les facteurs Nod sont des lipochito-oligosaccharides (LCOs) constitués de 3 à 5 groupements N-acétyl-glucosamines et portant une chaîne d'acides gras composée de 16 à 20 carbones, différente selon l'espèce de rhizobium. Cette chaîne est un déterminant majeur de la spécificité d'une espèce de rhizobium donnée pour sa plante hôte (Perret et al., 2000) (**Figure 11**). Cependant, certaines espèces et souches produisent un mélange de plusieurs facteurs Nod leur permettant ainsi d'établir des interactions symbiotiques avec plusieurs plantes hôtes. Les facteurs Nod sont suffisants pour induire les réponses symbiotiques essentielles au développement des nodosités, nouveaux organes symbiotiques sur les racines des légumineuses. La reconnaissance des facteurs Nod se fait par des récepteurs sur la membrane plasmique de type kinase (NFP et NFR5 chez *M. truncatula*) qui portent un domaine LysM extracellulaire capable de fixer les chitoooligosaccharides (Limpens et al., 2003). Cette reconnaissance entraîne la mise en place d'un messenger secondaire, le calcium. Il y a ensuite mise en place d'une oscillation calcique (Ca^{2+} spiking) dans la région nucléaire. La perception des oscillations calciques active une protéine kinase calcium et calmoduline dépendante (CCaMK) qui

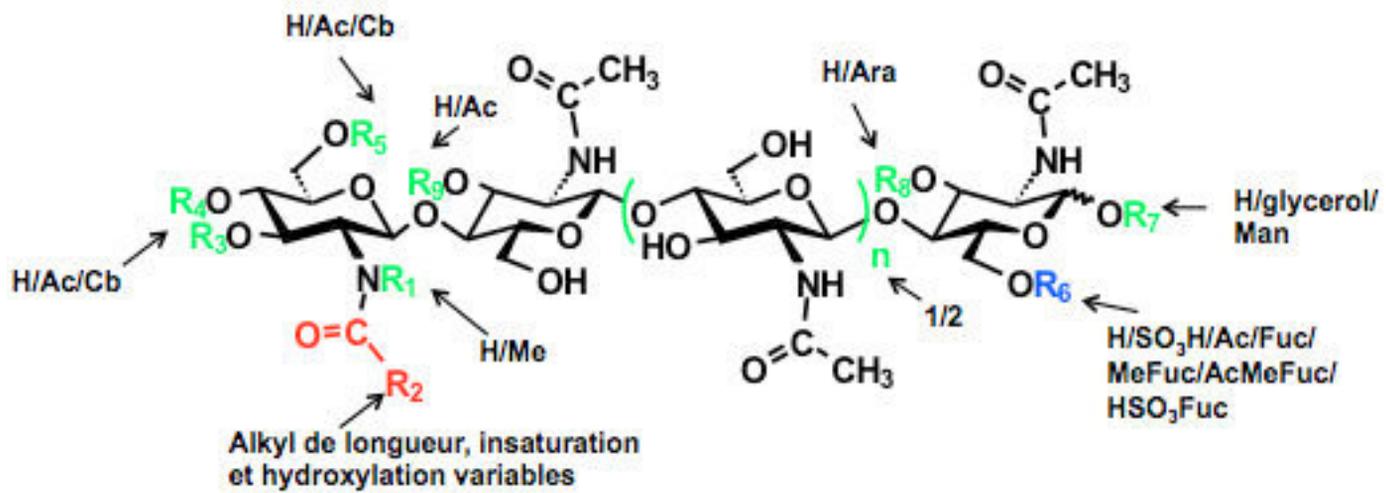


Figure 11 : Les facteurs Nod

Structure générale des facteurs Nod produits par les rhizobia. La présence de résidus numérotés de R1 à R9 est variable selon la souche de rhizobium.

Extrait de : Societechimiquedefrance.fr

phosphoryle une protéine de fonction inconnue (CYCLOPS). Suite à cela, de nombreux facteurs de transcription sont induits (NSP1, NSP2, ERF, ERN1) permettant l'organogénèse nodulaire (Oldroyd et al., 2011 ; Oldroyd, 2013) (**Figure 12**). D'autre part, les facteurs Nod jouent également un rôle essentiel dans l'infection racinaire par les bactéries. En effet, ils induisent une déformation des poils absorbants en crosse de berger, permettant l'emprisonnement et constituant la porte d'entrée des bactéries dans la racine. La progression des rhizobia s'effectue au sein d'un cordon d'infection, dont la formation nécessite des modifications du cytosquelette de la cellule végétale pour former un tunnel transcellulaire (**Figure 13**) (Oldroyd and Downie, 2008). Simultanément à l'infection, l'activation mitotique des cellules corticales situées sous le cordon d'infection conduit à la formation d'un primordium nodositaire. Le cordon d'infection pénètre les cellules de l'épiderme et du cortex racinaire. Puis, par un phénomène d'endocytose, les bactéries sont relarguées et se retrouvent entourées de la membrane d'origine végétale (membrane pér bactéroidienne), formant ainsi une entité appelée symbiosome (Streng et al., 2011) (**Figure 13**). Il va s'en suivre une série d'endoreduplication et de différenciation pour la cellule végétale infectée. Il y a également différenciation de la bactérie, pour que celle-ci devienne un bactéroïde fixateur d'azote.

2. Organogénèse

a) Nodosités déterminées et indéterminées

Chez les légumineuses de la sous-famille des Papilionoideae, les nodosités peuvent être de type déterminé ou indéterminé. Dans le cas de nodosités déterminées, la division cellulaire requise pour la formation du primordium nodositaire cesse rapidement et il n'y a pas de méristème persistant dans ces nodosités. La différenciation des cellules infectées se fait de façon simultanée et la nodosité mature contient des cellules contenant des bactéroïdes. Les légumineuses telles que le haricot (*Phaseolus vulgaris*) ou le lotier (*Lotus japonicus*) forment des nodosités déterminées (**Figure 14**).

Les nodosités de type indéterminé ont un méristème persistant qui permet à la nodosité de s'allonger. De la région apicale à la région basale, on distingue quatre zones correspondant à différents stades de développement. La zone la plus apicale est la zone méristématique (Zone I), puis on distingue la région sous-jacente (Zone II) qui est le siège de l'infection rhizobienne. Dans l'interzone II/III, les cellules végétales et

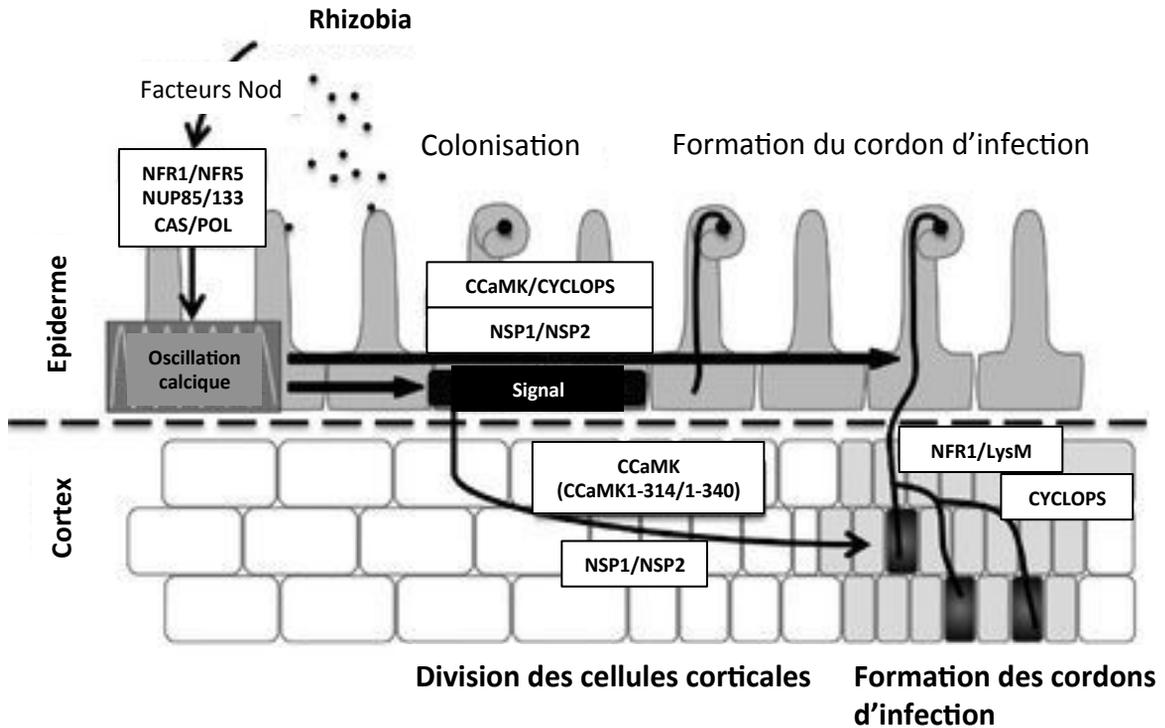
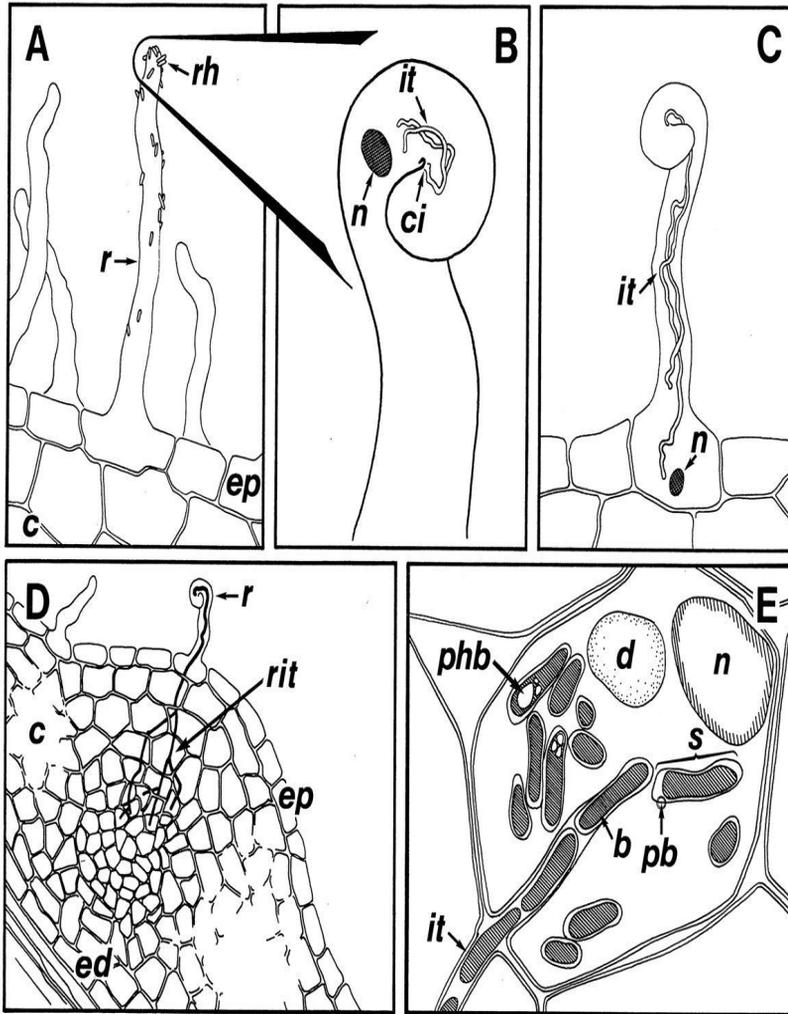


Figure 12 : Schématisation des processus d'infection coordonnés régulés par des gènes symbiotiques

L'oscillation calcique, induite par NFR1 / NFR5 et les gènes en amont, est indispensable pour le développement du cordon d'infection (IT) dans les poils absorbants. En aval de l'oscillation calcique dans l'épiderme, CCaMK, Cyclops et NSP2/NSP1 sont également impliqués dans la formation de l'IT. L'oscillation calcique est également impliquée dans la division cellulaire corticale. NFR1 LysM et d'autres récepteurs peuvent agir ensemble pour percevoir les facteurs Nod, conduisant à l'invasion des rhizobiums à travers des cellules corticales. CAS, CASTOR; POL, POLLUX.

Adapté de : Teruyuki Hayashi *et al.*, 2013



n: noyau
 D: vacuole digestive
 Ep: épiderme
 Ed: endoderme

Figure 13 : Schématisation de l'infection des rhizobium dans les poils absorbants de la racine de légumineuse et de la pénétration dans la cellule végétale

(A) Les rhizobium qui colonisent la rhizosphère (rh) s'attachent au niveau des poils absorbants (R), (B) les facteurs Nod induisent une déformation des poils absorbants et permettent la pénétration des bactéries dans un centre d'infection (CI). (C) Un cordon d'infection (IT) progresse et rejoint la base des poils absorbant pour permettre l'avancée des bactéries. (D) S'ensuit une ramification de celui-ci (rit) proche du primordium nodositaire formé par les cellules du cortex en division. Les bactéries sont relarguées du cordon d'infection par endocytose et forment le symbiosome (S) dans les cellules nodositaires. Les granules de poly- β -hydroxybutarate (phb) s'accumulent autour de la membrane péribactéroïdienne (pb).

bactériennes se différencient et l'accumulation d'amyloplast (stockage de l'amidon) a lieu. La zone dans laquelle les bactéries, différenciées en bactéroïdes capables de fixer l'azote atmosphérique, est la zone de fixation (Zone III). Enfin, dans la partie basale de la nodosité, la plus âgée, on trouve une zone de sénescence (Zone IV) où les bactéroïdes puis les cellules végétales se dégradent et meurent (Vasse et al., 1990).

b) La différenciation des cellules végétales

L'organogenèse de la nodosité est initiée suite à la perception des facteurs Nod bactériens qui réactivent les cellules du cortex bloqués en G0, ce qui conduit à l'activation de divisions cellulaires et la formation du primordium nodositaire (Kondorosi and Kondorosi, 2004).

Dans les deux types de nodosités, la différenciation des cellules végétales infectées s'accompagne de leur élargissement qui va contribuer à la croissance de la nodosité et est associée à une succession de cycles d'endoreduplication résultant en une ploïdie de 64 à 128 jeux de chromosomes (64C à 128C). Le processus d'endoreduplication correspond à une modification du cycle cellulaire puisque la réplication du génome a lieu mais n'est pas suivie par une mitose et cytokinèse. De façon générale, des cellules à un stade de ploïdie élevé ont une taille plus importante, une activité métabolique accrue, et un contenu en organelles supérieur en comparaison de cellules diploïdes non différenciées. Les cellules végétales différenciées peuvent contenir des milliers de bactéroïdes. Dans la zone de fixation (III), il n'y a plus de production de facteur Nod, l'expression des gènes du cycle cellulaire est arrêtée et les cellules végétales ont terminé leur endoreduplication (Vinardell et al., 2003).

3. Devenir des bactéries dans la nodosité fonctionnelle

a) Analyses de mutants

L'analyse de différents mutants bactériens a permis de révéler différents signaux développementaux et étapes dans la progression de l'interaction symbiotique. Les mutants bactériens qui ne peuvent pas entraîner de divisions cellulaires, sont incapables de former des nodosités (Nod-), présentent un défaut dans des gènes responsables de la synthèse de facteurs Nod (Spaink, 2000). Les mutants bactériens avec un défaut dans la synthèse des exopolysaccharides de surface sont eux incapables d'infecter la plante. C'est le cas des mutants *exoH* et *exoA* qui présentent un défaut dans

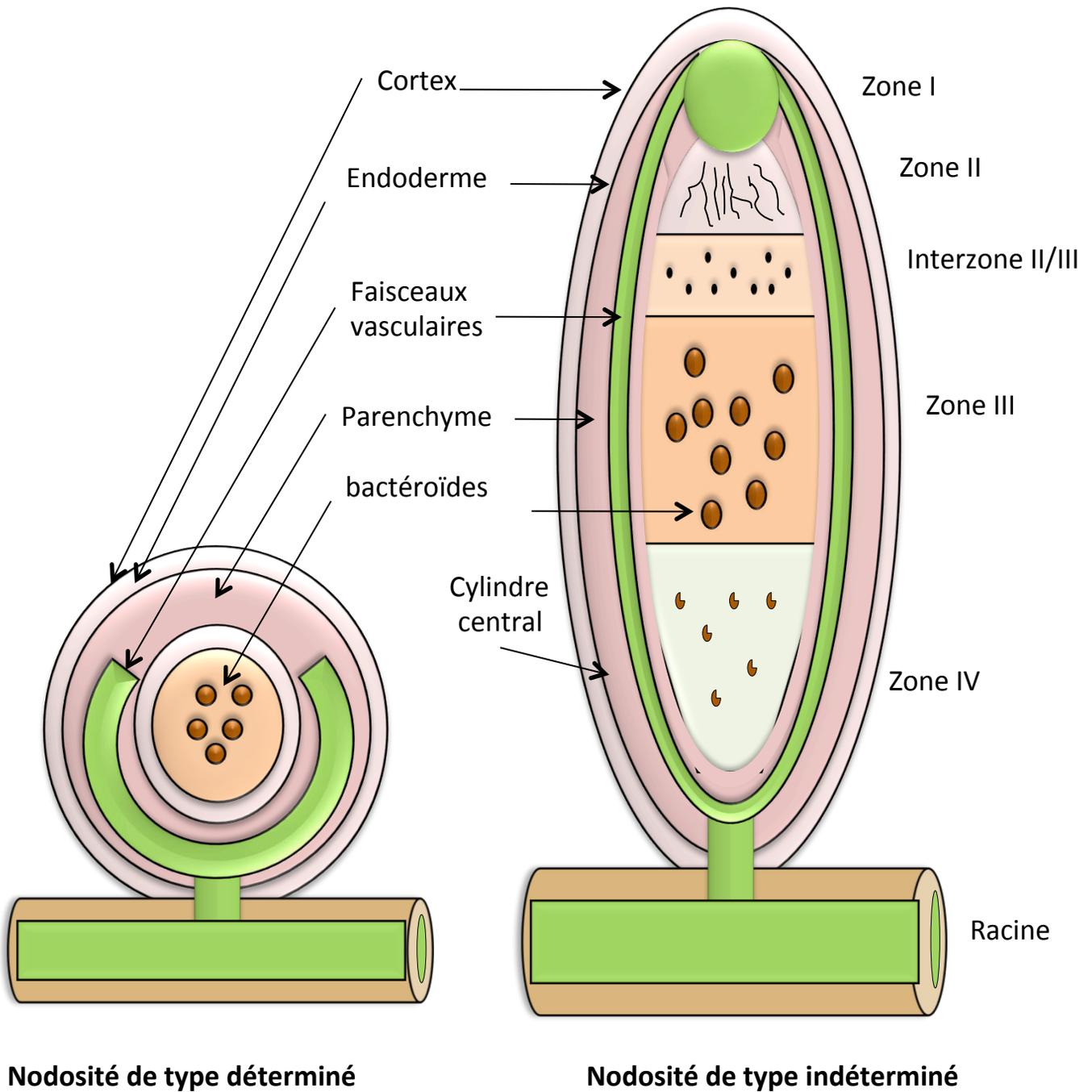


Figure 14 : Représentation schématique de nodosités de type déterminé et indéterminé

la biosynthèse d'exopolysaccharides, et conduisent à la formation de cordons d'infection avortifs (Lehman and Long, 2013). Les mutants bactériens qui sont capables d'infecter la plante, de démarrer la différenciation en bactéroïdes mais incapables de fixer l'azote (Fix⁻), présentent un défaut dans la signalisation ou les composants enzymatiques essentiels pour la réduction de l'azote atmosphérique en ammonium. Ainsi, les mutants *fixJ* et *nifD* incapables de synthétiser la nitrogénase, sont toutefois relargués dans la cellule végétale, où ils se différencient en bactéroïdes non fonctionnels qui dégèrent rapidement (Mitra and Long, 2004).

Cette méthode d'analyse des phénotypes symbiotiques de mutant d'inactivation d'un gène a été optimisée pour réaliser des approches plus globales. Ainsi, pour permettre une meilleure compréhension du fonctionnement du génome de *S. meliloti*, de larges banques de mutants, issus de mutagenèse aléatoire, ont été construites. Notamment, il existe une banque de 12.000 mutants de *S. meliloti* obtenus par insertion du mini-transposon Tn5 et pour laquelle le site d'insertion a été identifié pour 5000 mutants (Pobigaylo et al., 2006).

Des mutants de plante ont également fait l'objet d'études phénotypiques en interaction symbiotique. Quatre classes de mutants ont été définies en fonction de leurs phénotypes après infection par une souche bactérienne WT. Les mutants Nod⁻, qui ne sont pas capables de noduler, présentent un défaut dans des gènes impliqués dans la croissance cellulaire et/ou dans la réponse aux signaux bactériens. Par exemple, le mutant *dmi1* perçoit les facteurs Nod, induit une oscillation calcique mais est incapable d'induire une réponse à cette oscillation ni d'induire l'expression des gènes impliqués dans la symbiose. Les mutants qui sont capables d'induire la formation de nodosités mais qui sont incapables de fixer l'azote sont Fix⁻ et les mutants qui présentent un nombre excessif de nodosités sont supernodulants. L'identification de ces mutants de plantes a permis la caractérisation de gènes requis pour la mise en place de la symbiose. Chez *M. truncatula*, plusieurs gènes induits durant la nodulation et appelés « nodulines » ou « Enods » (early nodulines) ont été identifiés (Cook et al., 1995).

Par la suite, avec l'accumulation de banques d'EST de *M. truncatula* et d'approches de transcriptomiques et de bioinformatiques chez les deux partenaires de la symbiose, des données sur les profils d'expression de différents gènes à différentes étapes de la symbiose ont pu être mis en évidence (Mitra et al., 2004).

b) Transcriptomes nodositaires

D'importants changements transcriptionnels ont lieu dans la nodosité dès la zone d'infection. Plusieurs centaines de gènes ont été montrés comme spécifiquement induits ou réprimés durant la mise en place de la nodosité. La plupart de ces gènes sont activés transitoirement au cours du processus. Afin de mieux déterminer les gènes végétaux impliqués dans la différenciation terminale des bactéries en bactéroïdes et dans l'endoreduplication des cellules végétales chez *M. truncatula*, le transcriptome de nodosités mutantes a été comparé à un transcriptome de référence (Maunoury et al., 2010). Les auteurs de cette étude ont ainsi pu mettre en évidence qu'il y avait plusieurs étapes de changement de transcriptome dans la nodosité. Premièrement, une répression des gènes de défense de la plante, nécessaire à l'entrée des bactéries, a lieu. Puis, une activation transitoire des gènes du cycle cellulaire, impliqués dans la différenciation des cellules végétales et l'organogenèse est observée. Enfin, l'activation de la voie de sécrétion, associée à l'expression d'un grand nombre de protéines transmembranaires et de protéines ou de peptides sécrétés est observable, tout au long de l'organogenèse nodositaire (Maunoury et al., 2010).

Plus récemment, une étude transcriptomique réalisée spécifiquement dans la zone II d'infection, extraite de nodosités par microdissection laser, a permis de mettre en évidence, en comparaison avec le transcriptome de nodosité entière, l'induction spécifique de 288 gènes et la répression de 257 gènes, dans cette zone II (Damiani et al., 2012). Des analyses fonctionnelles ont permis de mettre en évidence que les principaux processus de cette zone étaient la glycolyse, la synthèse d'ATP par activation de la chaîne d'électrons mitochondriale, les métabolites secondaires et la synthèse protéique. De plus, 122 gènes codant des peptides nodositaires riches en cystéines appelés NCR (pour nodule-specific cysteine-rich peptides) sur les 328 gènes NCR caractérisés chez *M. truncatula*, ont été montrés comme induits dans cette zone (Damiani et al., 2012).

Au cours de ces dix dernières années, de nombreux transcriptomes du partenaire bactérien ont également été réalisés. *S. meliloti* ayant deux modes de vie possibles, libre ou symbiotique, cela implique une capacité à modifier son métabolisme en conséquence. De profondes modifications sont ainsi observées durant la différenciation en bactéroïdes avec 16% environ de gènes altérés durant le processus (Damiani et al., 2012). Les principaux changements concernent une diminution de l'activité métabolique permettant une adaptation à la vie symbiotique et une activation de la capacité fixatrice d'azote. En condition symbiotique, l'environnement microaérobie nécessaire à l'activation de la nitrogénase et de la fixation d'azote est un des principaux

facteurs des changements transcriptionnels observés chez le bactéroïde dans la nodosité, environ 5% des gènes sont régulés par l'oxygène. L'activation notamment du régulateur à deux composantes FixLJ entraîne une cascade de régulation composée de nombreux gènes dont ceux codant pour la nitrogénase. Ces résultats ont été obtenus suite à des transcriptomes réalisés en condition de stress microoxie (Becker et al., 2004). D'autres conditions ont également été étudiées comme l'addition de facteurs plantes ou de stress abiotiques, et les transcriptomes résultants ont été comparés à ceux réalisés sur des bactéries en culture pure (Becker et al., 2004). Afin d'avoir une meilleure vision des gènes exprimés au cours du processus symbiotique, une étude transcriptomique a été réalisée sur des nodosités prises à différents temps post-inoculation (5, 8, 14 et 18 jours post-inoculation) ainsi qu'en comparant le profil d'expression de nodosités infectées par une souche WT et une souche mutante bloquée dans les premières étapes symbiotiques (*bacA*) (Ferguson et al., 2002). Le profil d'expression des gènes bactériens dans des nodosités à 5 jours post-inoculation est similaire à celui d'une bactérie en croissance exponentielle en culture pure. Les profils, très différents à partir de 8 jours post-inoculation, suggèrent alors un changement du transcriptome bactérien, corrélé à l'apparition d'une nodosité fonctionnelle fixatrice d'azote. Ce profil d'expression est similaire à celui d'une bactérie en phase stationnaire, synonyme d'un arrêt de croissance (Capela et al., 2006). Enfin, plus récemment une étude transcriptomique par séquençage « nouvelle génération » (RNAseq) a été réalisée après microdissection des différentes zones d'une nodosité fonctionnelle, permettant ainsi de connaître de façon spatio-temporelle, l'expression des gènes bactériens et plantes au cours du processus symbiotique (Roux et al., 2014). Ainsi les gènes *nodABC* impliqués dans la synthèse de facteurs Nod sont spécifiquement induits dans la zone II distale ce qui corrèle avec leur rôle dans les premières étapes de l'infection. Les gènes *nifA* et *fixK* dépendant du régulateur FixLJ codant des protéines impliquées dans la fixation de l'azote sont surexprimés dans l'interzone II-III et dans la zone III. Les gènes codant les catalases KatA, B et C, comme décrit dans d'autres études, présentent bien une expression différentielle avec induction en zone III pour KatA, zone II et III pour KatC, et une expression constitutive pour KatB. Les différences d'expression de gènes bactériens ne se font pas au sein de la zone II (II distale et II proximale) mais entre la zone II et la zone III (Roux et al., 2014). Les données d'expression dans les différentes zones de la nodosité âgée de 15 jours post-inoculation, accessibles sur un site web, représentent une ressource précieuse pour les microbiologistes et de biologistes de plantes.

En conclusion, ces différentes analyses transcriptionnelles chez les deux partenaires ont ainsi permis une meilleure vision globale des gènes impliqués dans les premières étapes

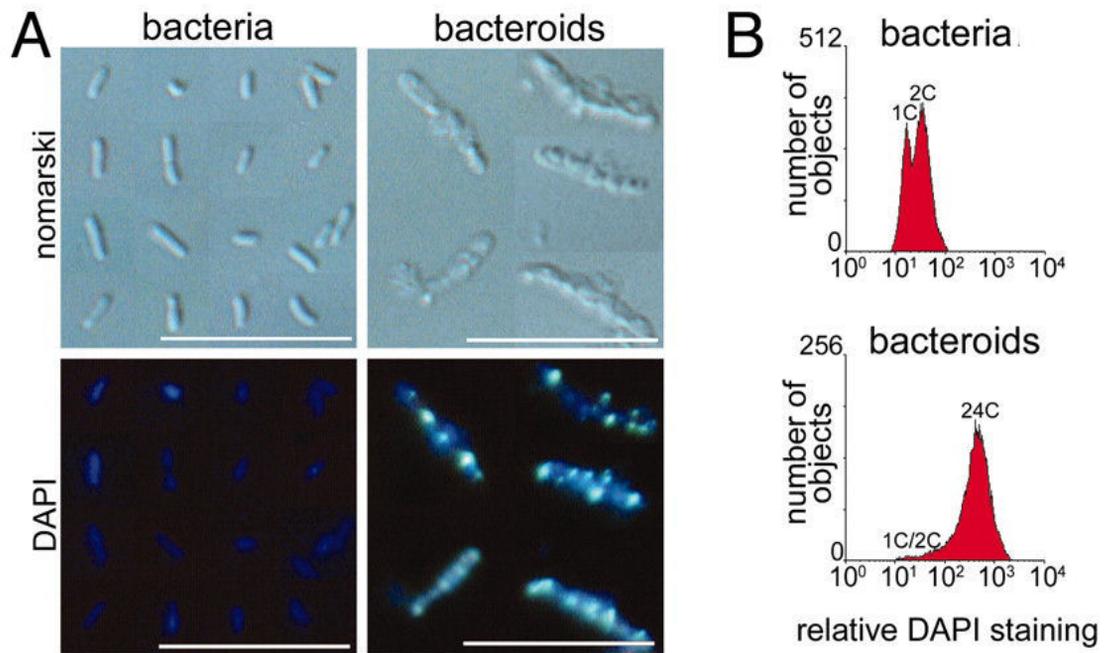


Figure 15 : La différenciation des bactéries en bactéroïde

Mesure de la taille, la forme et le contenu en ADN de bactéries *S. meliloti* en culture et de bactéroïdes extraits de nodosité de *M. truncatula*. (A) Images de microscopie Nomarski (haut) et à fluorescence (Bas) de bactéries et bactéroïdes marqués au DAPI. (B) Contenu en ADN de bactéries et bactéroïdes marqués au DAPI par mesure de cytométrie en flux.

de mise en place de la symbiose et de ceux induits dans la nodosité fonctionnelle fixatrice.

c) Différenciation des bactéroïdes

De façon synchronisée avec la différenciation des cellules végétales, les bactéries se différencient en bactéroïdes capables de fixer l'azote atmosphérique. Ces bactéroïdes, ont un métabolisme adapté à la vie symbiotique et leur différenciation est accompagnée de brutaux changements morphologiques et/ou physiologiques (Kondorosi et al., 2013).

La morphologie des bactéroïdes diffère en fonction des légumineuses infectées et du type de nodosités développées. Ainsi, les bactéroïdes fixateurs de nodosités déterminées ne sont morphologiquement pas affectés (morphotype U), et restent de taille similaire aux bactéries en culture libre. Chez les légumineuses de la famille des galégoïdes dont les nodosités sont indéterminées comme *Medicago*, des changements importants de la forme des bactéroïdes peuvent être observés comme : une élongation (morphotype E) ou un allongement accompagné d'un « gonflement » (morphotype S) ou encore l'apparition de formes en Y. Chez *S. meliloti*, le bactéroïde a une taille 4 à 7 fois supérieure à la bactérie en mode de vie libre.

Mergaert et collaborateurs (Mergaert et al., 2006) ont comparé la physiologie des bactéroïdes issus de nodosités déterminées (*Mesorhizobium loti* - *Lotus japonicus*) et de nodosités indéterminées (*S. meliloti* - *Medicago truncatula*). Les bactéroïdes de *M. loti* possèdent le même contenu en ADN et ils maintiennent leur capacité reproductive après réisolement sur boîtes de Pétri, démontrant l'état réversible de leur différenciation. Au contraire, les bactéroïdes de *S. meliloti* ont leur génome amplifié jusqu'à 24 fois par rapport à celui des bactéries libres (**Figure 15**) et ont perdu leur capacité à se reproduire (Kondorosi et al., 2013). La perte de la capacité reproductive de *S. meliloti* sous sa forme bactéroïde s'accompagne de l'absence de formation du septum et d'une répartition inégale du génome. La différenciation terminale des bactéries en bactéroïdes affecte également la perméabilité membranaire. Cette étude montre également qu'une souche de rhizobium capable d'interagir avec des légumineuses galégoïdes et non galégoïdes présente une différenciation terminale ou réversible selon la plante hôte, suggérant que la différenciation terminale est gouvernée par des facteurs présents chez la plante (Mergaert et al., 2006).

Les peptides «Nodule-specific Cysteine-Rich » ou NCR font partie des effecteurs végétaux impliqués dans la différenciation terminale des bactéries en bactéroïdes. Les

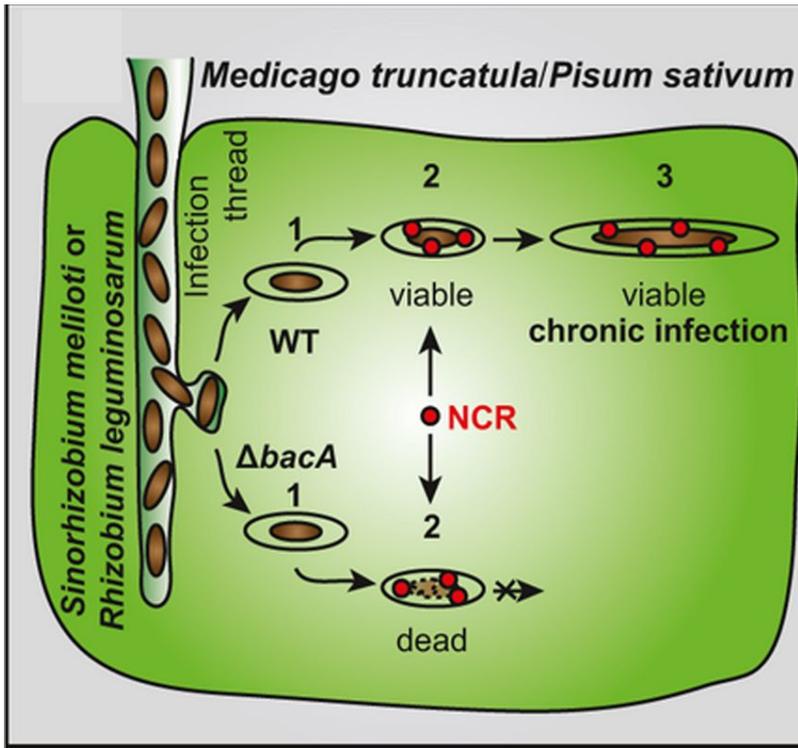


Figure 16 : La protéine BacA de *S. meliloti* semble essentielle à la protection contre l'effet toxique des peptides NCR

Chez les légumineuses comme *M. truncatula*, les bactéries relarguées par endocytose dans la cellule végétale forment les symbiosomes. Sous l'action des peptides NCR, les bactéries intracellulaires vont rentrer dans un programme de différenciation terminale en bactéroïdes fixateurs d'azote. Le rôle de BacA n'est visible que chez des légumineuses produisant des NCR. Un mutant déficient en BacA présente un phénotype Fix^- associé à un blocage dans la différenciation du bactéroïde, lequel, non viable dans la cellule végétale, subit rapidement une dégradation.

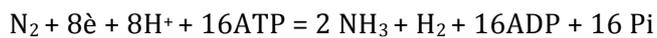
gènes codant les NCRs forment une famille d'environ 500 gènes fortement exprimés dans les nodosités et trouvés uniquement chez les plantes de la famille des galégoïdes (Gyorgyey et al., 2000; Mergaert et al., 2003; Guefrachi et al., 2014). Chaque gène est composé de deux exons, le premier codant un peptide signal de sécrétion et le second un NCR mature d'une séquence de 30-50 acides aminés, peu conservé entre les différents NCRs à l'exception de 4 ou 6 résidus cystéïnes. Les NCRs sont synthétisés uniquement par les cellules végétales infectées et sont adressés aux bactéroïdes via une voie de sécrétion nodule-spécifique (Van de Velde et al., 2010; Wang et al., 2010; Haag et al., 2011; Farkas et al., 2014).

Ces peptides ressemblent aux défensines, une catégorie de peptides antimicrobiens impliqués dans la défense immunitaire des eucaryotes (Boman, 1995; Graham et al., 2004). De fait, plusieurs NCRs synthétisés chimiquement ont une activité antimicrobienne vis-à-vis de *S. meliloti* et d'autres espèces bactériennes (Nallu et al., 2013; Tiricz et al., 2013). A des doses subléthales, NCR247 induit un blocage de la division cellulaire associé à une endoreduplication du chromosome qui rappellent le phénomène observé lors de la différenciation de la bactérie en bactéroïde (Haag et al., 2011; Haag et al., 2012). Ce processus a été corrélé à une modification de l'expression des gènes du cycle cellulaire et à une interaction avec FtsZ, prévenant la formation du septum de division (Farkas et al., 2014; Penterman et al., 2014). Des analyses globales de spectrométrie de masse ont permis d'identifier d'autres protéines bactériennes interagissant avec NCR247, parmi lesquelles la protéine chaperonne GroEL et plusieurs protéines ribosomiques (Farkas et al., 2014).

Les NCRs ont également pour cibles les constituants membranaires et leur effet toxique *in vitro* s'accompagne d'une augmentation de la perméabilité membranaire (Haag et al., 2011; Tiricz et al., 2013). La protéine membranaire BacA de *S. meliloti*, semble jouer un rôle essentiel dans la protection vis-à-vis des NCRs puisqu'un mutant *bacA* présente une hypersensibilité au NCR247. De façon intéressante, le gène *bacA* est essentiel à la survie de *S. meliloti* dans les cellules de la plante hôte sauf chez un mutant Dnf1 de *M. tuncatula*, suggérant que la protéine BacA protège les bactéries de l'effet toxique des NCRs *in planta* (Haag et al., 2011) (**Figure 16**).

**d) Zone de fixation de l'azote (ZIII) : Métabolisme carboné,
Microoxie et Nitrogénase**

En zone III, les bactéries différenciées en bactéroïdes synthétisent la nitrogénase et fixent l'azote atmosphérique. La fixation biologique de l'azote est très coûteuse en énergie. La respiration fournit l'énergie à la cellule qui permet d'approvisionner la nitrogénase de 16 molécules d'ATP requises pour la réduction du diazote atmosphérique (N₂) en deux molécules d'ammonium (NH₃).



Du fait de la sensibilité à l'oxygène de la nitrogénase, les légumineuses maintiennent des conditions de microoxie dans la nodosité en limitant la perméabilité des cellules à l'oxygène par une barrière de diffusion et en synthétisant de la léghémoglobine dans les cellules végétales infectées. La léghémoglobine va ainsi réduire la concentration en oxygène libre dans la zone de fixation tout en maintenant un flux élevé d'O₂ pour la respiration du bactéroïde. Cette expression élevée de léghémoglobine est responsable de la couleur rose de la partie fixatrice de la nodosité (Jones et al., 2007). Le passage bactérie/bactéroïde est couplé à l'induction de gènes bactéroïdiens essentiels à la réduction du N₂ en NH₃, les gènes *nif* (communs aux gènes des diazotrophes libres) et les gènes *fix* (propres aux diazotrophes symbiotiques). La fixation du diazote nécessite l'activation d'un grand nombre de gènes *nif* et *fix* (9 gènes *nif* chez *S. meliloti*). L'expression des gènes *nifH*, *nifD* et *nifK* est centrale dans le processus de fixation de l'azote puisqu'ils codent pour les complexes protéiques de la nitrogénase. NifA lui est un régulateur central qui, à faible pression en oxygène et couplé au facteur sigma 54, active la transcription des gènes *nif* et *fix* (Jones et al., 2007; Masson-Boivin et al., 2009).

Le NH₃ produit par la nitrogénase après réduction du N₂, est en partie sécrété par les bactéroïdes où il est pris en charge par la plante via des canaux à NH₄⁺ présents sur la membrane pér bactéroïdienne et est ensuite assimilé via la voie des amides (glutamine et asparagine) et des uréides. Un apport constant de carbone de la cellule végétale vers le bactéroïde est essentiel pour alimenter le métabolisme énergétique nécessaire à la différenciation en bactéroïdes et à la fixation d'azote. Des granules de polyhydroxybutyrate (PHB) produits par *S. meliloti* sont dégradés durant le processus de différenciation et semblent être utilisés préférentiellement comme source de carbone dans le cordon d'infection. Par la suite, les sucres issus du processus photosynthétique de la plante vont être utilisés comme source de carbone par les bactéroïdes. Ces photosynthétats sont donnés à la bactérie sous la forme de dicarboxylates. Le malate est

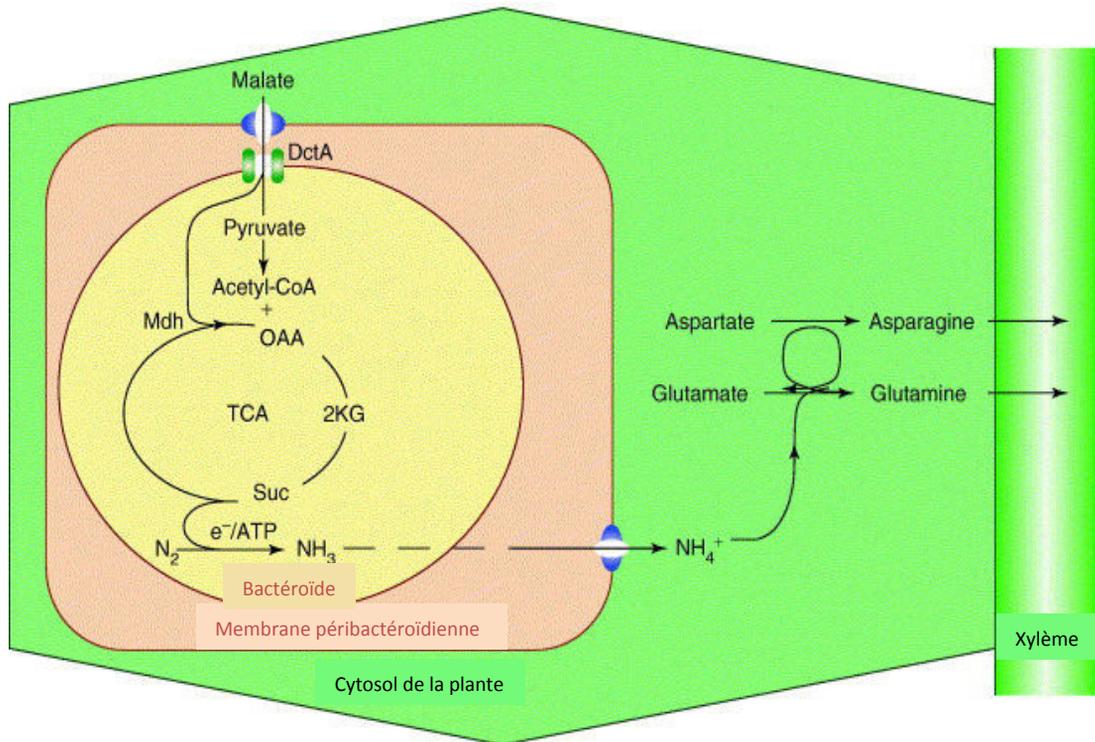


Figure 17 : Fixation d'azote et énergie métabolique

Modèle de l'échange de carbone et d'azote au cours de la symbiose fixatrice d'azote. Les sources de carbone (malate, succinate ou fumarate) sont fournies au bactéroïde par la plante et le diazote réduit en ammonium par le bactéroïde via la nitrogénase est fourni à la plante. L'ammonium est ensuite incorporé dans la voie de l'asparagine et de la glutamine dans le cytosol de la plante.

Adapté de : Juergen P. and Poole P. 2006

la première forme de carbone assimilée par le bactéroïde. Ce malate est transporté dans les bactéroïdes via un transporteur de dicarboxylate bactéroïdien (DctA) (**Figure 17**).

D. Sénescence nodositaire

1. Mise en place du processus de sénescence : changements structuraux

La période pendant laquelle une nodosité fixe l'azote de façon optimale est comprise entre 4 et 5 semaines après inoculation pour *M. truncatula*, en condition de laboratoire. Après cette période, les premières réductions de capacité fixatrice d'azote sont détectables et le processus de sénescence démarre dans la zone IV de la nodosité. Le fait que cette interaction Plante-Rhizobia soit courte, a des conséquences sur le rendement végétal (Dupont et al., 2012).

Au cours du processus de sénescence, le contenu des cellules des deux partenaires est dégradé. Bien que la zone de fixation d'azote soit constamment renouvelée, la zone de sénescence augmente en fonction de l'âge de la nodosité. La sénescence se fait en deux étapes, dans un premier temps, une dégradation des bactéroïdes suivie de la résorption des symbiosomes s'opère, ce qui est associé à la présence caractéristique de nombreuses vésicules dans le cytoplasme de la cellule végétale. Dans un deuxième temps, la cellule végétale est dégradée. Cela se traduit au niveau de l'ultrastructure des nodosités, par la présence de deux zones distinctes au niveau de la zone IV, une zone de sénescence jeune et une zone de sénescence âgée. Dans la zone jeune, les bactéroïdes sont dégradés et seulement peu de cellules végétales le sont. Dans la zone âgée, après la résorption des symbiosomes, la dégradation des cellules végétales est également observée (Van de Velde et al., 2006) (**Figure 18**). Une autre caractéristique de la sénescence nodositaire est le déclenchement d'un large éventail d'activités protéolytiques qui provoquent la dégradation des protéines à grande échelle (Pladys and Vance, 1993). La léghémoglobine est dégradée durant le processus de sénescence, ce qui entraîne une coloration verte visible sur les nodosités présentant une zone de sénescence.

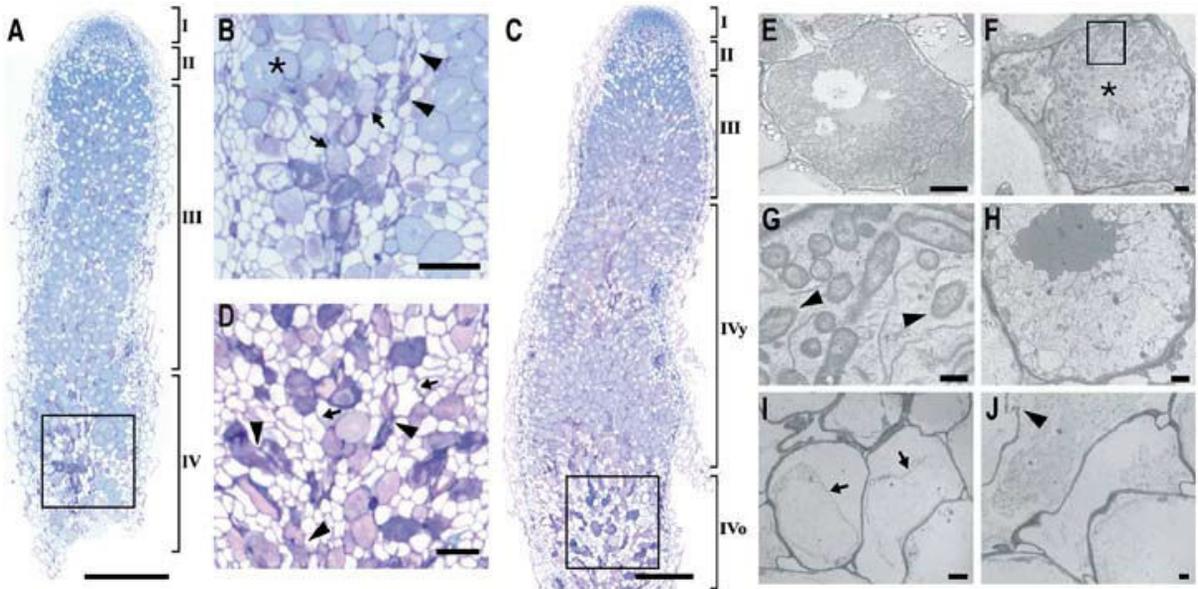


Figure 18 : Analyse histologique de la mise en place de la sénescence nodositaire

Analyses microscopiques de nodosités sénescentes de *M. truncatula*.

(A) et (C) Coloration au bleu de toluidine de coupes longitudinales de nodosités de 35 et 65 jours post-inoculation. Cette dernière présentant une zone de sénescence jeune (IVy) et âgée (IVo). (B) et (D) Agrandissement du rectangle en (A) et (C), respectivement. (E) à (J) image de microscopie électronique à transmission (TEM). (E) de cellule végétale fixatrice remplie de bactéroïdes, (F) d'une cellule en zone jeune de sénescence avec une réduction du nombre de bactéroïdes. (G) Agrandissement du rectangle en F montrant la dégradation de la membrane péri-bactéroïdienne. (H) d'un bactéroïde sénescents en résorption, (I) et (J) de cellules végétales en sénescence avec la perte de la membrane plasmique et perte de l'intégrité cellulaire.

I méristème, II zone d'infection, III zone de fixation, IV zone de sénescence; y: jeune et o: âgée.

(B)*: Cellule végétale comportant des bactéroïdes fixateurs;

(B) et (O) flèches noires montrent les cellules sénescents;

(F)*: Dégradation de la membrane péri-bactéroïdienne

Bar 500µm (A et C), 100 µm (B et D) 10µm (E) 2µm (F-H-J), 500nm (G)

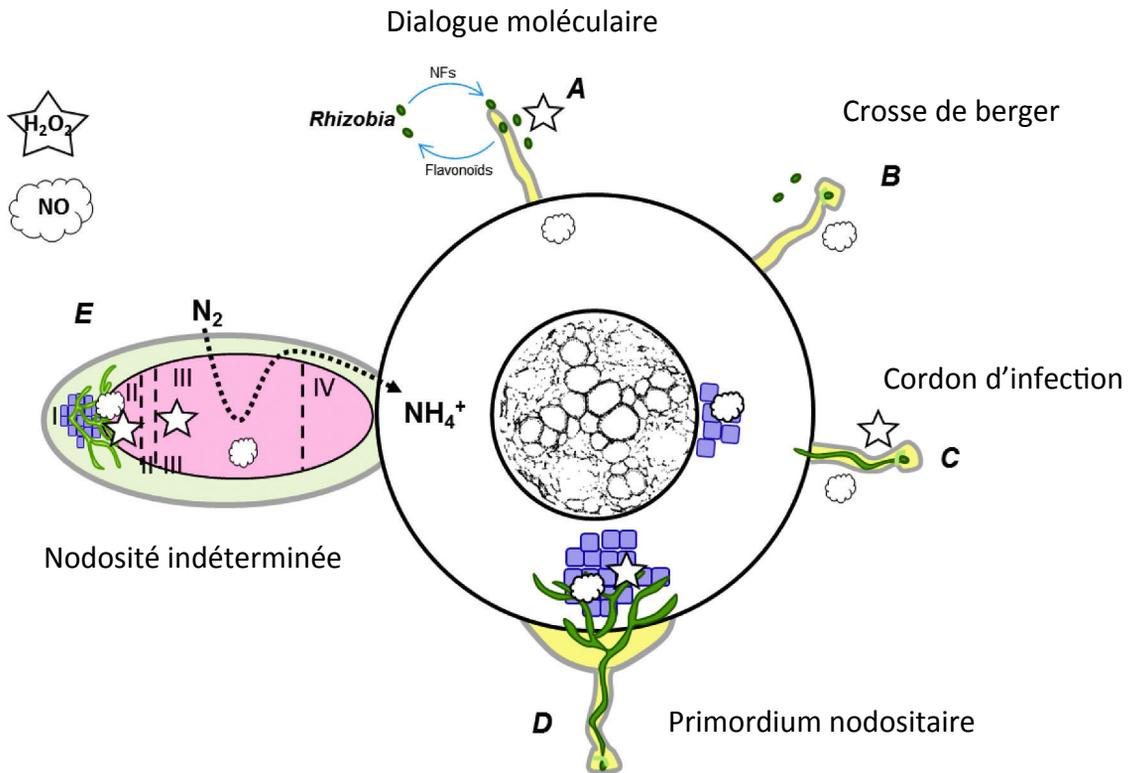


Figure 19 : Schéma représentant l'implication des EAO (Espèces Actives de l'Oxygène) et du NO (Monoxyde d'azote) dans les différentes étapes de la symbiose

La production d' H_2O_2 (étoile) et de NO (nuage) aux cours des différentes étapes de la symbiose fixatrice d'azote (A, B, C, D, E).

Adapté de : Puppo A. *et al.* 2013

2. Etat redox et sénescence

Les espèces actives de l'oxygène (EAO) résultent de l'addition d'un ou plusieurs électrons sur une molécule d'oxygène et incluent, l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Ces molécules sont des sous-produits de l'activité métabolique des cellules et la majorité des EAO (90%) sont produites par les chaînes de transports d'électrons répartis sur les mitochondries et chloroplastes, le réticulum endoplasmique, les membranes plasmiques et nucléaires, et les systèmes photosynthétiques (Mittler et al., 2004) (Starkov, 2008). Une autre partie moins importante est produite par les systèmes enzymatiques tels que les NADPH oxydases (NOX), lipoxigénases, cyclooxygénases, xanthine oxydases et superoxyde dismutases (Bueno et al., 2001; Puppo et al., 2013). Etant responsables de dommages sur des molécules essentielles de la vie, telles que les lipides, protéines et acides nucléiques, les EAOs ont été longtemps considérées comme uniquement délétères. De fait, de nombreux systèmes de détoxification enzymatique des EAO existent chez les organismes vivants. Ainsi, les superoxydes dismutases (SOD) sont des enzymes responsables de la transformation de l' $O_2^{\cdot-}$, EAO extrêmement toxique, en H_2O_2 , moins toxique mais plus mobile. Les catalases sont, quant à elles, responsables de la détoxification de l' H_2O_2 en O_2 et H_2O . Il existe également des systèmes de détoxification non enzymatiques des EAOs, tels que l'acide ascorbique ou le glutathion (Pauly et al., 2006; Puppo et al., 2013).

Les EAO, au-delà de leurs effets délétères, peuvent également jouer le rôle de molécules signal et ont été montrées comme impliquées dans différentes étapes de la symbiose (**Figure 19**). Outre leur rôle dans les premières étapes d'infection (Lohar et al., 2007), ils sont également retrouvés, accumulés dans la jeune nodosité, au niveau des cellules végétales infectées. L'origine de l'accumulation d'EAO dans la nodosité n'est pas entièrement connue. Cependant, des homologues de NADPH oxydases animaux (NOX) ont été trouvés chez les plantes. Elles sont dénommées Rboh pour « Respiratory Burst Oxidase Homologue » et 10 gènes codant pour ces protéines membranaires ont été identifiés chez *M. truncatula*. L'analyse de leurs profils d'expression montre que certains d'entre eux sont induits dans la nodosité, notamment *rbohA*, exprimé dans la zone III de la nodosité (Marino et al., 2011) (**Figure 20**).

En plus des EAO, le monoxyde d'azote (NO), un gaz diffusible connu comme molécule signal chez les plantes (floraison, défense), a été montré comme également présent dans les premières étapes de la symbiose (Del Giudice et al., 2011) (**Figure 19**). Une analyse transcriptomique a montré qu'une déplétion du NO entraîne la répression

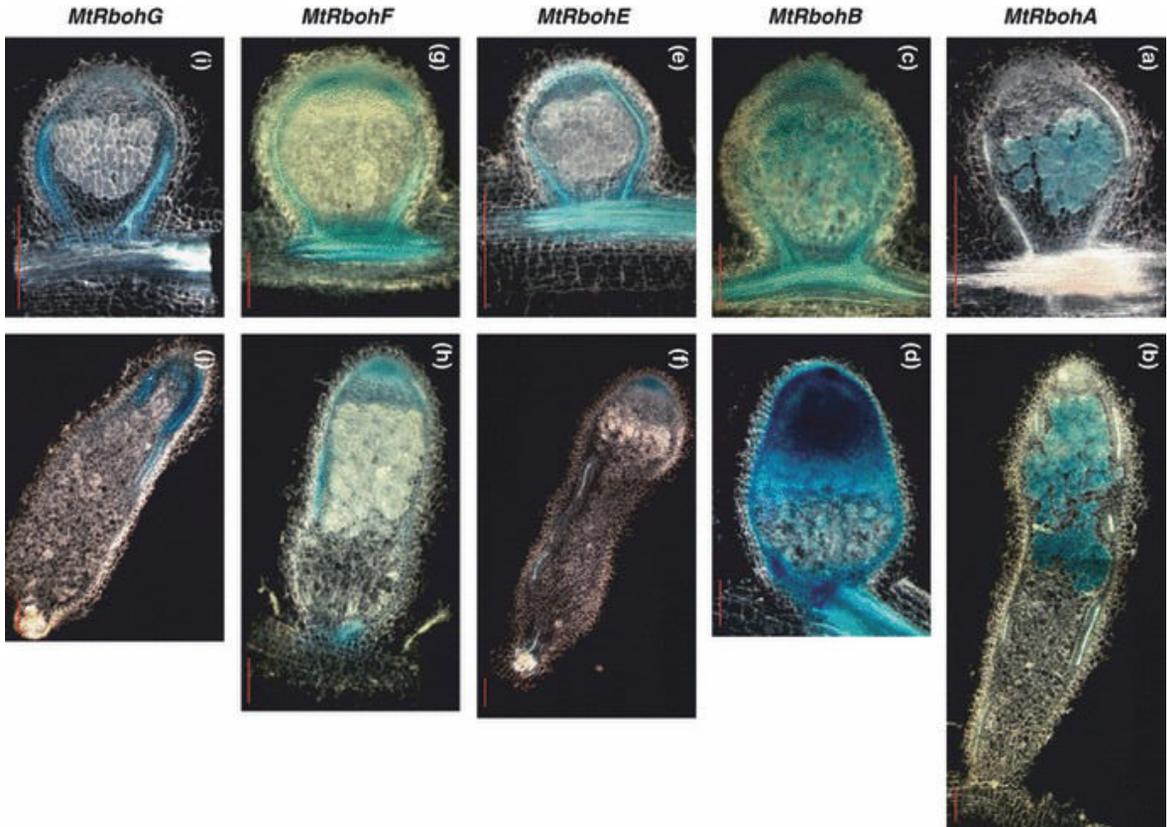


Figure 20 : Profil d'expression des gènes *rboh* dans la nodosité de *M. truncatula*

Analyse histochimique de l'expression des gènes *rboh* codant des NADPH oxydases dans la nodosité de *Medicago truncatula* induite par *S. meliloti*. Les nodosités sont âgées de 12 jours post-inoculation (a, c, e, g, i) et 5-7 semaines post-inoculation (b, d, f, h, j). *MtRbohA* (a, b), *MtRbohB* (c, d), *MtRbohE* (e, f), *MtRbohF* (g, h), *MtRbohG* (i, j). Bars, 200 µm. $n > 20$.

Extrait de Marino D. *et al.* 2011

de nombreux gènes de plantes impliqués dans le développement de la nodosité, ainsi qu'une diminution du nombre de nodosités (Boscari et al., 2013).

L'équilibre redox cellulaire est défini par un équilibre entre la production d'EAO et leur détoxification. L'ascorbate (Asc), le glutathion (GSH) et l'homoglutathion (hGSH) sont les acteurs majeurs de l'équilibre redox dans les cellules des légumineuses (Becana et al., 2010). La présence d'hGSH, un homologue du glutathion, est l'une des caractéristiques des légumineuses. La déficience en synthèse d'hGSH et de GSH dans des plantes transgéniques de *M. truncatula* entraîne un blocage dans la formation de nodosités (Frendo et al., 2005). Les EAO n'ont jamais été détectées dans le microsymbiote, suggérant que les rhizobia sont également dotés de systèmes de défenses antioxydantes très efficaces (Santos et al., 2001) Pour détoxifier les EAO, la bactérie symbiotique possède entre autre des superoxyde dismutases qui permettent la dismutation de l' $O_2 \cdot^-$ en H_2O_2 (Hérouart et al., 1996), trois catalases (KatA, B et C) (Jamet et al., 2007), une chloroperoxydase permettant la détoxification de l' H_2O_2 , des réductases d'hydropéroxydes lipidiques (Fontenelle et al., 2011) et des défenses non enzymatiques incluant le GSH (Frendo et al., 2013). Il a été montré que la régulation du niveau d' H_2O_2 par la défense antioxydante bactérienne module la nodulation. Ainsi les doubles mutants *katB/katC* présentent un phénotype drastique d'avortement de la nodosité, associé à l'absence de différenciation en bactéroïde (Jamet et al., 2003 ; Jamet et al., 2007). De même, les glutarédoxines (GRX) sont des petites oxydoréductases (9-14 kD) qui catalysent la réduction des ponts disulfures en utilisant le pouvoir réducteur du GSH. Les mutants de deux GRX de *S. meliloti*, SmGRX1 et SmGRX2, présentent des phénotypes de perte de capacité fixatrice d'azote et d'altération de la nodosité. Cependant, le mutant SmGRX1 présente un défaut de différenciation des bactéries en bactéroïdes alors que le mutant SmGRX2 n'induit pas d'effet sur cette différenciation (Benyamina et al., 2013).

Le processus développemental de sénescence a été proposé comme étant le résultat d'une chute du pool antioxydant d'ascorbate-gluthation, couplé à une chute du ratio carbone/azote dans la nodosité (Puppo et al., 2005). Au cours de la mise en place de la sénescence, une diminution de la teneur en léghémoglobine est également observée dûe à une diminution de son expression ainsi qu'à sa dégradation. Cette dégradation entraîne la libération d'ions fer qui peuvent participer, via la réaction de Fenton, à la production d'EAO (Puppo et al., 2005) (**Figure 21**).

En conclusion, production d'EAO et baisse des défenses anti-oxydantes (Groten et al., 2006) contribuent à la sénescence nodositaire.

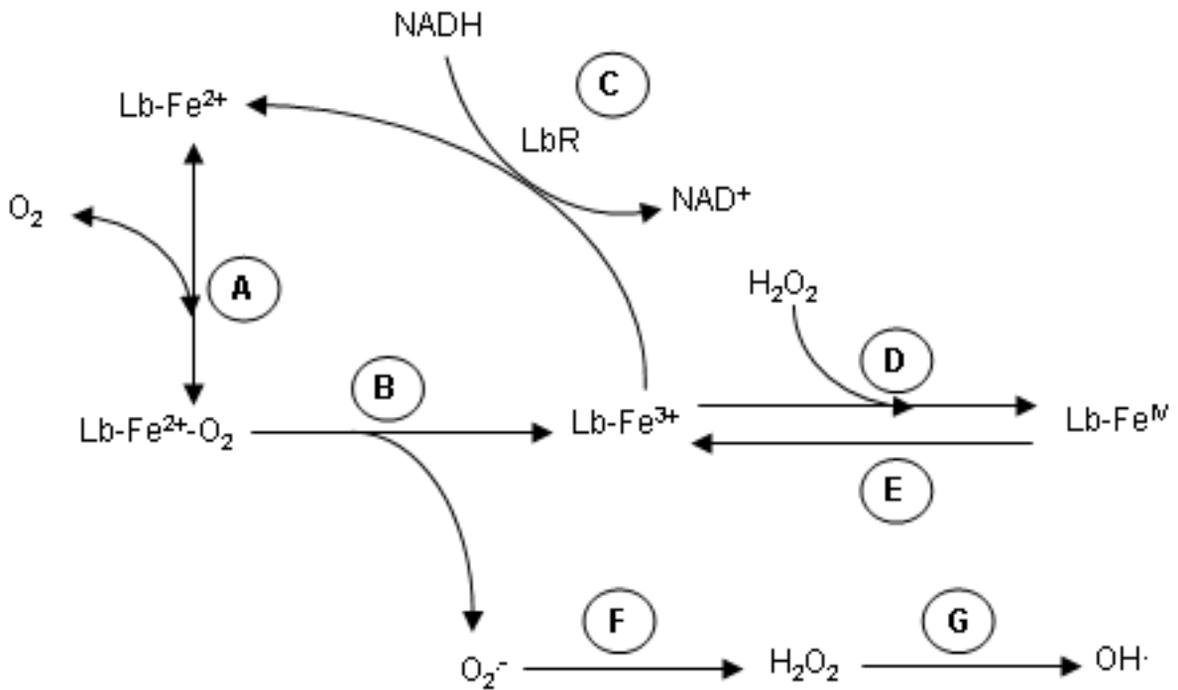


Figure 21 : Signalisation impliquant la leghémoglobine (Lb) et la formation d'EAO

(A) l'oxygénation réversible de Lb-Fe²⁺; (B) Auto-oxydation de Lb-Fe²⁺-O₂ en Lb-Fe³⁺ avec relargage d'O₂⁻ (C) Réduction de Lb-Fe³⁺ par la Lb ferrique réductase (LbR) (D) Réaction de H₂O₂ avec Lb-Fe³⁺ pour générer la forme inactive Lb-Fe^{IV}(ferry) (E) Réduction de Lb-Fe^{IV} en Lb-Fe³⁺ par l'ascorbate ou les thiols. D'autres EAOs peuvent être générés à partir d'O₂⁻ par sa dismutation en H₂O₂ (F) et à partir d'H₂O₂ (G).

Extrait de Dupont L. *et al.* 2012

3. Gènes de plantes induits lors de la mise en place du processus de sénescence nodositaire

Une étude réalisée sur *M. truncatula*, par la méthode de l'ADNc-AFLP, a permis de démontrer que le processus de sénescence était complexe et soumis à une régulation génétique (Van de Velde et al., 2006). Une collection de 508 gènes, différentiellement exprimés lors de l'entrée en sénescence, a été obtenue en comparant des nodosités jeunes de 21 jours post-inoculation avec les parties fonctionnelles et sénescentes de nodosité mature de 35 et 61 jours post inoculation (**Figure 22**). L'identification des gènes induits en zone de sénescence suggère l'implication des voies de signalisation de 3 phytohormones (éthylène, jasmonate et gibbérélines) ainsi que de facteurs de transcription. Enfin, on retrouve des gènes impliqués dans le métabolisme comme ceux codant pour des protéases par exemple. Ces protéases avaient déjà été auparavant mises en évidence comme étant induites dans une nodosité sénescence par une analyse de banque d'EST chez *M. truncatula* (Fedorova et al., 2002).

Parmi ces protéases induites, deux protéases en particulier : une papaine-like protéase (MtCP6) et une légumaine protéase, appelée « Vacuolar Processing Enzyme » (MtVPE) ont été mises en évidence dans les deux études citées précédemment. MtVPE a été également montrée comme induite dans le cadre d'une sénescence naturelle (Pérez et al., 2010). Pierre O. et coll., ont démontré que les deux gènes MtCP6 et MtVPE, étaient de bons marqueurs du passage d'un état fixateur à un état sénescence. A l'aide de plantes transgéniques exprimant des fusions promoteur-*gus*, ils ont pu montrer que ces deux gènes étaient induits lors de la sénescence naturelle. La réduction de l'expression de ces gènes par ARN interférant entraîne un retard de sénescence nodositaire associé à une meilleure fixation d'azote, alors que leur expression prématurée en zone III à l'aide du promoteur du gène codant le NCR001 induit un processus de sénescence accélérée (Pierre et al., 2014).

4. Gènes bactériens impliqués dans la rupture de l'interaction symbiotique

Alors que de nombreuses études ont permis de mettre en évidence l'importance des gènes bactériens dans le développement d'une nodosité fonctionnelle, le rôle du partenaire bactérien dans le maintien et l'interruption de l'interaction symbiotique, dans le cadre d'une sénescence naturelle, sont très peu documentés. En particulier, on

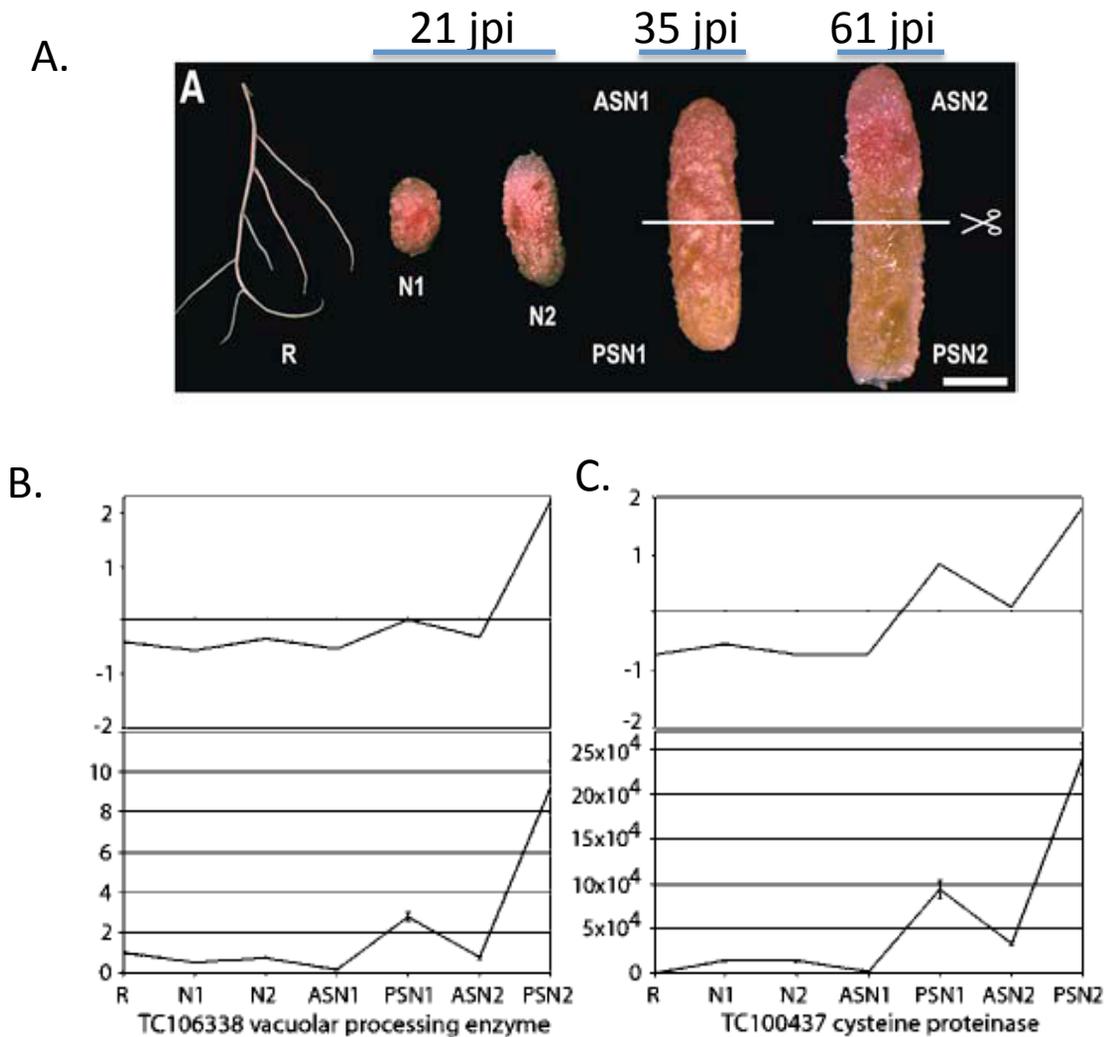


Figure 22 : Analyse de cDNA-AFLP sur nodosités de *M. truncatula*

(A) Etude de la sénescence nodositaire par cDNA-AFLP chez *M. truncatula*. Les ARN étudiés sont soit issus de nodosités entières (N1 et N2) âgées de 21 jours post-infection (jpi) arrondies ou plus allongées, sans zone de sénescence, soit des parties apicales (ASN1/ASN2) ou basales (PSN1/PSN2) de nodosités âgées de 35 et 61 jpi avec respectivement une petite et grande zone de sénescence (observable en vert).

La barre de taille représente 5 mm.

Des analyses de RTqPCR ont été réalisées pour valider les analyses de cDNA-AFLP pour deux gènes marqueurs de la sénescence : MtVPE (B) et MtCP6 (C). La partie supérieure représente le profil en cDNA-AFLP et inférieure, celui en RTqPCR.

Adapté de : Van de Velde *et al.*, 2006

ne dispose pas à l'heure actuelle de données transcriptomiques sur les changements d'expression globaux des gènes du bactéroïde qui précèdent le passage d'un état fixateur à sénescence.

Toutefois, des travaux portant sur des mutants d'inactivation ou de surexpression de gènes bactériens montrent que la bactérie joue un rôle dans l'entrée en sénescence (Dupont et al., 2012). Les mutants bactériens présentant un phénotype de sénescence précoce sont, soient i) bloqués dans leur différenciation en bactéroïdes (nod+ fix-), soient ii) différenciés en bactéroïdes mais incapables de fixer l'azote (nod+ fix-) enfin iii) ils peuvent être différenciés en bactéroïdes, fixer l'azote atmosphérique mais avoir une moins bonne capacité fixatrice d'azote qu'une souche sauvage (nod+ fix+/-).

On retrouve donc dans ces différents mutants bactériens qui entraînent un phénotype de sénescence précoce, ceux impliqués dans la machinerie de fixation de l'azote (par exemple : *nifH*, *fixA*, *fixJ* et *fixK*) (Maunoury et al., 2010), la défense antioxydante (par exemple : *grx*, *hmp*, *gshB*, *katA*, *katC*) (Jamet et al., 2003; Harrison et al., 2005; Cam et al., 2012; Benyamina et al., 2013), la biosynthèse de lipopolysaccharides (*lspB*) mais aussi codant pour des protéines régulatrices (Hfq) (Torres-Quesada et al., 2010) ou impliqués dans la réponse aux stress abiotiques (RpoH) (Mitsui et al., 2004).

Des études récentes ont permis de montrer que le NO, qui joue un rôle majeur dans la mise en place de la symbiose rhizobium-légumineuse, est également important dans les étapes tardives de cette interaction. La teneur en NO dans la nodosité mature a pu être analysée ainsi que son impact sur l'entrée en sénescence. Ainsi, une augmentation du niveau de NO dans la nodosité entraîne une diminution de la capacité fixatrice d'azote et une sénescence précoce. D'autre part, chez *S. meliloti*, un mutant *hmp* déficient en une flavohémoglobine impliquée dans la détoxification du NO présente un phénotype de diminution de la capacité fixatrice d'azote, en interaction avec *M. truncatula* (Meilhoc et al., 2010). Environ 40 à 50 % des nodosités inoculées avec la souche *hmp* présentent une zone de sénescence dès 3-4 semaines post-inoculation, alors que cette dernière n'apparaît qu'à 5 semaines post-inoculation dans des nodosités inoculées avec la souche WT. Ces résultats démontrent une sénescence nodositaire précoce associée à un niveau de NO plus élevée (Cam et al., 2012). Inversement, un mutant bactérien surexprimant la flavohémoglobine (*hmp++*) entraîne un phénotype de retard de sénescence. Des plantes de *M. truncatula* inoculées avec cette souche mutante présentent seulement 35% de nodosités sénescentes à 9 semaines post-inoculation. Ainsi la dégradation du NO dans une nodosité mature contribue au retard du processus de mise en place de la sénescence.

Un autre exemple d'entrée en sénescence nodositaire retardée chez *M. truncatula* a été décrit. lors de l'interaction avec une souche de *S. meliloti* surexprimant une flavodoxine d'*Anabaena variabilis* (Redondo et al., 2009). Cette protéine est une flavoprotéine bactérienne intervenant dans des réactions d'oxydoréduction. Elle contient un groupement FMN qui en fait un centre redox régulant le transport d'électrons et susceptible de faciliter la détoxification des EAO. Sa surexpression induit un retard de la sénescence qui s'accompagne d'une capacité fixatrice d'azote supérieure suggérant que ce phénotype est majoritairement dû à une protection accrue des bactéroïdes face à un stress oxydatif ressenti *in planta*.

Ainsi, le bactéroïde dans la nodosité infectée n'est pas uniquement tributaire de la plante pour initier le processus de sénescence mais est également acteur dans ce processus. Des gènes codant des protéines impliquées dans la nutrition et dans la réponse au stress oxydatif sont essentiels à la différenciation de la bactérie en bactéroïde mais également à sa survie dans la cellule végétale. Les mutants bactériens dans ces gènes entraînant des phénotypes de nodosités abortives suggèrent le passage d'une interaction compatible à incompatible. Les acteurs moléculaires de ce changement restent encore à définir, de même que, plus généralement, ceux impliqués dans le mode de vie intracellulaire du bactéroïde fixateur. Enfin, les travaux sur la surexpression de la flavodoxine ou du mutant de surexpression *hmp⁺⁺*, montrent que l'interaction symbiotique peut également être optimisée en améliorant la résistance du bactéroïde à un stress abiotique perçu dans la nodosité, et ainsi retarder l'entrée en sénescence et améliorer le rendement végétal.

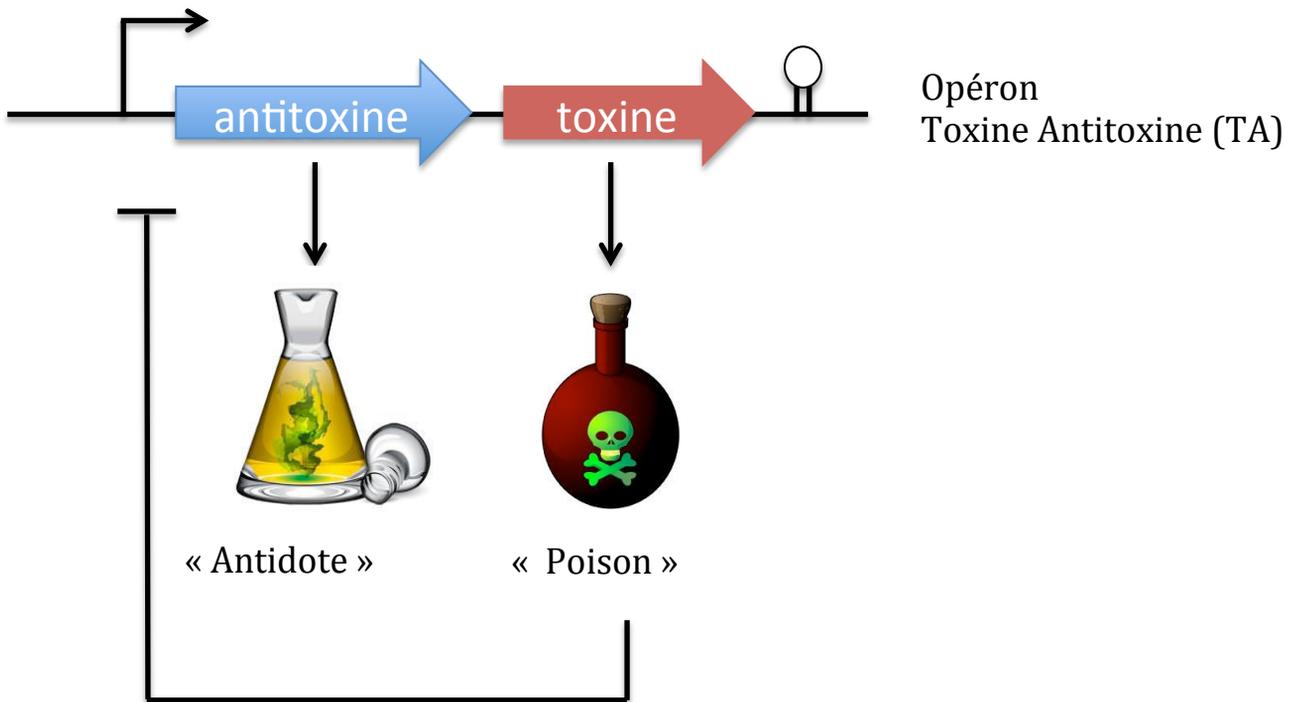


Figure 23 : Les systèmes toxine antitoxine

Les gènes codant les systèmes TA sont majoritairement organisés en opéron, permettant ainsi la co-production du «poison» et de «l'antidote» dans la cellule. La flèche représente la région promotrice. La structure tige/boucle symbolise le terminateur de transcription.

INTRODUCTION PARTIE 2 :

LES SYSTEMES TOXINES ANTITOXINES (TA)

Les systèmes Toxine Antitoxine (TA) sont des systèmes bactériens décrits comme pouvant entraîner un effet bactériostatique (dormance) ou bactéricide (programme de mort cellulaire bactérien), ou, chez des bactéries pathogènes humaines, comme jouant un rôle dans l'adaptation au stress lors de la colonisation de l'hôte et dans la survie intracellulaire. Dans le cadre du projet de thèse, portant sur l'étude de facteurs bactériens impliqués dans la sénescence nodositaire, ces systèmes TA sont donc des candidats intéressants. Cette partie 2 de l'introduction a pour but de faire l'état de l'art sur les connaissances concernant les systèmes TA des Bacteria.

I. Définition d'un système Toxine Antitoxine (TA)

Les systèmes Toxine Antitoxine (TA) sont codés par des opérons constitués de deux gènes dont l'un code une toxine (ou « poison ») et l'autre une antitoxine (ou « antidote ») (**Figure 23**). Dans la majorité des cas, l'antitoxine neutralise l'effet de la toxine par interaction directe. D'autre part, l'antitoxine agit généralement comme un répresseur transcriptionnel en se fixant sur la région promotrice de son propre opéron (Yamaguchi and Inouye, 2011).

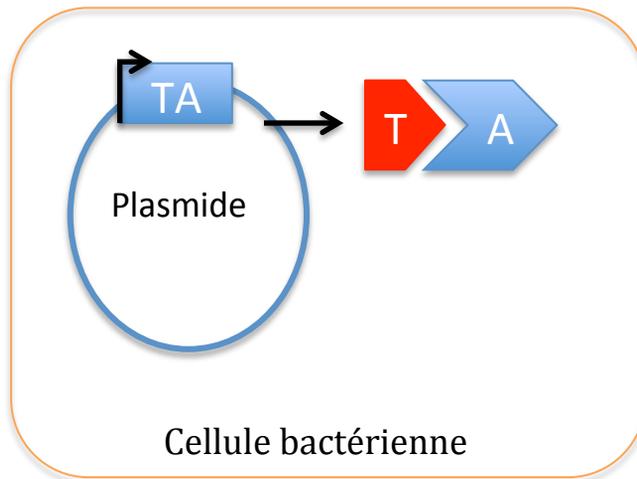
Initialement identifiés sur des plasmides, ces systèmes TA (ou modules) ont, par la suite, été retrouvés sur les chromosomes de très nombreuses bactéries (Pandey and Gerdes, 2005; Sevin and Barloy-Hubler, 2007). Ils ont alors été répertoriés en différents types (I à V) en fonction de leur organisation génique et du mécanisme de neutralisation de la toxine par l'antitoxine. Chaque type a ensuite été subdivisé en différentes familles suivant, notamment, le mode d'action de la toxine sur ses cibles moléculaires.

II. LA DECOUVERTE DES SYSTEMES TA

A. Les TA plasmidiques

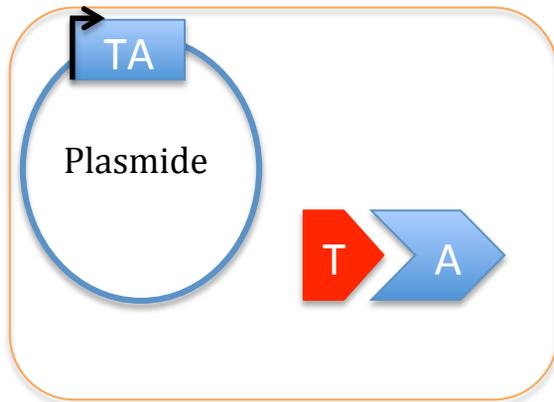
Chez les bactéries, en plus du chromosome, l'information génétique peut également être portée par un ou plusieurs plasmides. Ces plasmides, bien que non indispensables au métabolisme général et aux fonctions essentielles de la cellule, confèrent à la bactérie des caractères génétiques essentiels dans l'adaptation à des conditions environnementales

Cellule mère

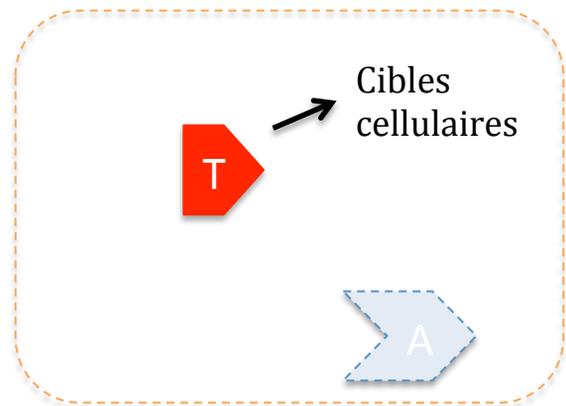


Cellules filles

Division
cellulaire



Survie



Mort cellulaire

Figure 24 : Les TA plasmidiques et leur rôle dans la ségrégation des plasmides (module d'addiction)

Suite à la division cellulaire, lorsqu'une cellule fille n'hérite pas du plasmide portant l'opéron TA, la présence de la toxine, plus stable que l'antitoxine, entraîne la mort de la cellule bactérienne.



Toxine



Antitoxine

particulières (notamment les résistances aux antibiotiques, la virulence, les facteurs symbiotiques, ou encore un métabolisme particulier). Le maintien de ces plasmides dans la population bactérienne dépend notamment de leur répartition entre les cellules filles après division cellulaire.

L'étude des processus de ségrégation des plasmides a permis, en 1983, de caractériser pour la première fois un système Toxine Antitoxine (Ogura and Hiraga, 1983). Ce système nommé CcdB/CcdA, porté par le plasmide F d'*Escherichia coli*, a été décrit comme un module d'addiction, responsable d'un phénomène appelé « Post-segregational Killing » (Bernard and Couturier, 1992; Masuda et al., 1993). Lors de la ségrégation, si la cellule fille perd le plasmide F, elle perd également l'opéron CcdB/CcdA. Pour autant, les protéines CcdB (toxine) et CcdA (antitoxine) provenant de la cellule mère se retrouvent dans le cytoplasme. Toutefois, la cellule fille accumule la toxine puisque l'antitoxine, instable, est dégradée plus rapidement, ce qui va entraîner sa mort (**Figure 24**).

La survie des cellules bactériennes abritant de tels plasmides, est donc dépendante de ces modules et du plasmide qui le porte. En conclusion, les modules d'addiction interviennent dans le maintien et la stabilité des plasmides (Hayes, 2003). Suite à cette première découverte, des systèmes de type TA ont ensuite été identifiés sur de nombreux plasmides de différentes espèces bactériennes (**Tableau 1**) (Hayes, 2003; Blower et al., 2012).

B. Les TA chromosomiques

L'existence de systèmes TA sur le chromosome a été révélée grâce au séquençage massif des génomes bactériens. Afin d'améliorer l'identification des systèmes TA, un algorithme appelé RASTA-Bacteria (pour Rapid Automated Scan for Toxins and Antitoxins in Bacteria), reposant sur les caractéristiques génomiques des T/A et sur l'existence de domaines fonctionnels conservés, a été développé (Sevin and Barloy-Hubler, 2007). Ce nouvel algorithme a nettement augmenté, par rapport à ceux précédemment utilisés (BLAST) (Gronlund and Gerdes, 1999; Pandey and Gerdes, 2005), les prédictions de systèmes TA putatifs présents sur les chromosomes bactériens.

En 2011, une base de données dédiée aux systèmes TA, (TA Database : TADB) disponible en ligne a été créée (<http://202.120.12.135/TADB2/index.php>) (Shao et al., 2011). Cette base de données qui est focalisée sur les systèmes de type II (système TA les plus abondants) rassemble les résultats des prédictions bioinformatiques (BLAST et RASTA) et des résultats expérimentaux. Elle compile les informations sur 10753 modules TA (dont 240 décrits dans des publications), appartenant aux 7 superfamilles décrites jusque-là (RelBE, MazEF, VapBC, HicAB, CcdBA, PhdDoc, HigBA), qui ont pu être identifiés sur 1240 génomes. Cette base de données permet d'élargir le champ d'étude des systèmes TA en offrant une diversité d'outils

Plasmide	Bactérie	Toxine (aa)	Antitoxine (aa)	Cible de la toxine
F	<i>E. coli</i>	CcdB (101)	CcdA (72)	ADN gyrase
P1	<i>E. coli</i>	Doc (126)	Phd (73)	Traduction?
RK2	<i>E. coli</i>	ParE (103)	ParD (83)	ADN gyrase
R1	<i>E. coli</i>	Kid (110)	Kis (84)	DnaB
pTF-FC2	<i>A. ferrooxidans</i>	PasB (90)	PasA (74)	ND
pSM19035	<i>S. pyogenes</i>	ζ (287)	ε (90)	ND
Rts1	<i>E. coli</i>	HigB (92)	HigA (104)	ND
P307	<i>E. coli</i>	RelE (95)	RelB (83)	ND
pMYSH6000	<i>S. flexneri</i>	MvpT (133)	MvpA (75)	ND
pRUM	<i>E. faecium</i>	Txe (85)	Axe (89)	ND

Tableau 1: La diversité des TA plasmidiques

Les systèmes de type II identifiés sur des plasmides. Ne sont listées que les protéines de systèmes TA typiques de chaque famille. aa: acides aminés; ND : Non déterminé

Extrait de : F. Hayes 2010

d'analyse (Blast, phylogénie...). Elle révèle une distribution abondante, ubiquiste et phylogénétiquement complexe de ces systèmes chez les bactéries et archae.

Il en ressort que ces systèmes TA paraissent particulièrement répandus chez les procaryotes présentant plusieurs modes de vie dont un mode de vie libre ou en interaction avec un hôte eucaryote (pathogène ou symbiotique) (ex : *Mycobacterium tuberculosis* (88 systèmes TA), *Nitrosomonas europaea* (57 systèmes TA), *Sinorhizobium meliloti* (29 systèmes TA). A l'inverse, les systèmes TA ne sont pas retrouvés chez des bactéries vivant en interaction obligatoire non cultivables en culture pure telles que *Mycobacterium leprae*, (bacille intracellulaire responsable de la lèpre chez l'homme et le tatou) ou *Buchnera aphidicola* (endosymbiote obligatoire de toutes les espèces de pucerons). La présence d'opérons TA sur le chromosome pose la question de leur rôle biologique distinct de celui des modules TA plasmidiques impliqués dans la ségrégation des plasmides. Une des hypothèses concernant le rôle des modules TA chromosomiques propose leur implication dans l'adaptation bactérienne à un changement d'environnement.

III. Les différents types de systèmes TA

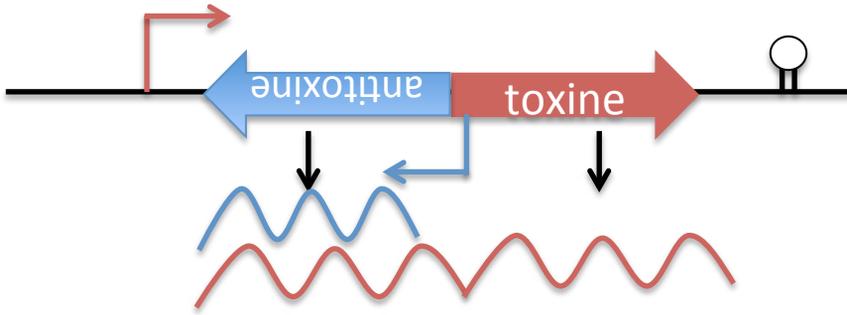
Comme en témoigne la création d'une base de données spécifique et le nombre croissant de publications, l'étude des systèmes TA des Bacteria et Archaea, est un champ d'étude en plein essor. En effet, les résolutions de l'organisation et du mécanisme d'action de ces systèmes, commencent à être bien élucidés, mais leur rôle biologique reste peu compris, alors qu'ils sont très répandus chez les procaryotes.

Les systèmes TA peuvent être classés en cinq « types » différents, suivant la nature de l'antitoxine (ARN ou protéine) et de son mode d'action. Ces cinq types, décrits ci-après, le sont dans la situation où l'antitoxine est présente et bloque l'action de la toxine (**Figure 25, 26 et 27**) (Unterholzner et al., 2013).

A. Les systèmes TA dont l'antitoxine est un ARN : types I et III

Les modules de type I sont retrouvés aussi bien sur les plasmides que sur les chromosomes (Brantl, 2012). Ces toxines sont généralement de petites protéines hydrophobes qui provoquent des dommages sur la membrane plasmique. L'antitoxine est un ARN non traduit présentant, dans la majorité des cas, une complémentarité avec l'ARNm de la toxine (**Figure 25A**). L'antitoxine régule l'expression de la toxine en inhibant la

A. Type I :



B. Type III :

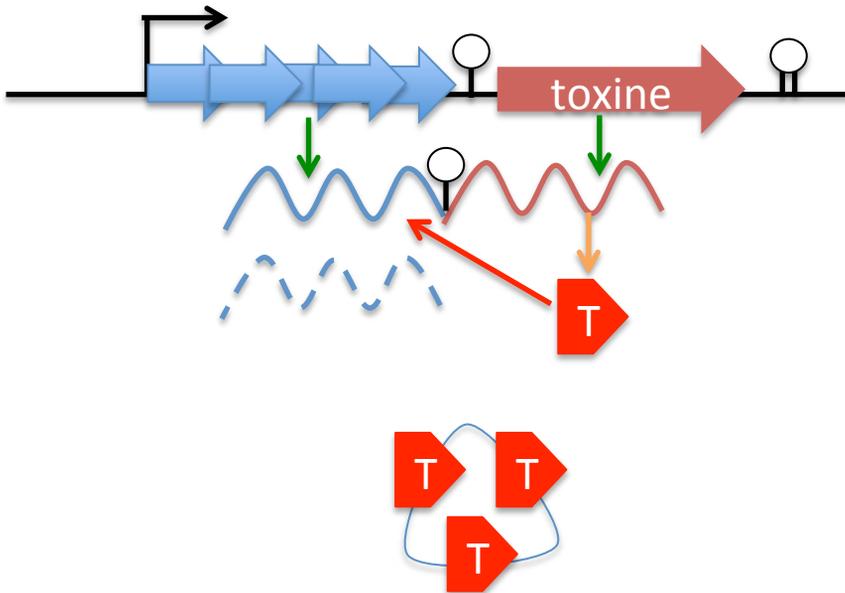


Figure 25 : L'organisation génétique des systèmes TA de type I et III

- (A) Type I : Le gène de la toxine code un peptide hydrophobe dont l'ARNm est bloqué dans sa traduction par l'ARN antisens de l'antitoxine.
- (B) Type III : L'ARN de l'antitoxine est constitué d'une répétition en tandem de 5,5 séquences longues de 36 nucléotides, qui vont être clivées par la toxine. Les fragments issus de ce clivage se fixent sur 3 monomères de toxines pour former un hétérohexamère et bloquer l'action de la toxine

L'antitoxine est représentée en bleu et la toxine en rouge.

La flèche verte représente la transcription et la flèche orange la traduction

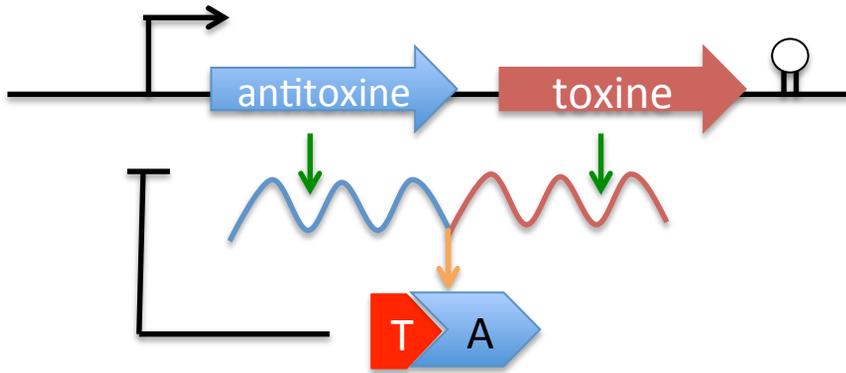
fixation des ribosomes sur l'ARNm, bloquant ainsi sa traduction, comme par exemple dans le cas du système SymRE (Kawano et al., 2007; Unterholzner et al., 2013).

Les systèmes TA de type III n'ont que récemment été décrits. Grâce à une étude phylogénique, 125 systèmes de type III putatifs, regroupés en 3 familles distinctes, ToxIN, CptIN et TenpIN, ont été identifiés. La majorité de ces systèmes est codée par des gènes chromosomiques bactériens. Toutefois environ 15% des systèmes T/A des familles ToxIN et TenpIN sont codés par des gènes plasmidiques et un système ToxIN est codé par un prophage. La fonctionnalité de plusieurs systèmes CptIN et TenpIN a été confirmée en démontrant la toxicité de CptN ou TenpN chez *E. coli* ainsi que sa neutralisation par l'antitoxine (Blower et al., 2012). Les systèmes T/A de type III repose sur une inactivation de la toxine par liaison directe de fragments de l'ARN non codant de l'antitoxine (**Figure 25B**). A ce jour, le seul système TA de type III entièrement caractérisé est le module ToxI/ToxN porté par le plasmide pECA1039 de *Pectobacterium carotovorum* et intervenant dans la protection de la bactérie contre l'infection de bactériophages (Blower et al., 2012). Dans ce système, le cadre de lecture du gène de la toxine ToxN est séparé de celui de l'antitoxine, ToxI par une courte répétition en orientation inversée donnant lieu à une structure en épingle à cheveux (**Figure 25B**). L'antitoxine ToxI est un petit ARN constitué de 5,5 répétitions en tandem de 36 nucléotides. La toxine ToxN est une protéine traduite à partir du transcrit qui présente une activité RNase susceptible de cliver le transcrit de l'antitoxine au niveau des séquences répétées en tandem. Aussi, l'action de ToxN permet la production de fragments d'ARN de l'antitoxine de 36 nucléotides qui constituent l'ARN actif. Ces fragments d'ARN vont alors se lier à la toxine ToxN pour former des hétérohexamères triangulaires (3ToxN/3ToxI) et ainsi inhiber son activité (Short et al., 2013).

B. Les systèmes TA où l'antitoxine est une protéine : type II et V

Les systèmes TA de type II sont les plus répandus dans les génomes bactériens. Ces modules TA sont codés par des opérons où le premier cadre ouvert de lecture correspond à l'antitoxine et le second à la toxine, exception faite des systèmes HigBA où l'ordre des gènes est inversé (Christensen-Dalsgaard and Gerdes, 2006). Dans le système TA de type II, l'antitoxine est une protéine qui se lie à la toxine pour former un complexe protéique dans lequel la toxine est neutralisée (**Figure 26A**). Ce complexe protéique, via le domaine de liaison à l'ADN porté par l'antitoxine, peut se fixer au niveau de la région promotrice pour

A. Type II :



B. Type V :

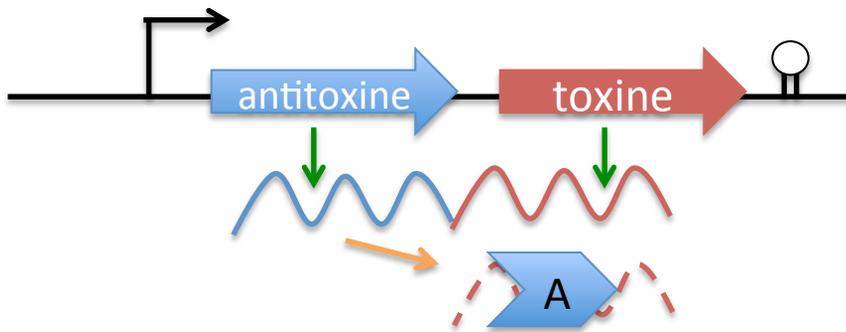


Figure 26 : L'organisation génétique des systèmes de type II et V

- (A) Type II : Toxine et Antitoxine sont des protéines formant un complexe protéique, l'action de la toxine est bloquée par sa liaison à l'antitoxine.
- (B) Type V : La région des transcrits correspondant au gène de la toxine est clivée par l'antitoxine, dotée d'une activité endoribonucléase.

réguler négativement l'expression de l'opéron (**Figure 26A**) (Unterholzner et al., 2013). Initialement, les systèmes de type II à deux composants ont été classés, suivant la structure des gènes et leur similarité de séquences, en 11 superfamilles (**Tableau 2**) où chaque famille de toxine était associée à son antitoxine. Toutefois, l'existence de systèmes hybrides où toxine et antitoxine appartenant à des superfamilles différentes mais qui interagissent entre elles, a récemment été démontrée (Leplae et al., 2011). Ainsi, il a été proposé de classer les toxines et les antitoxines de type II de façon indépendante en 13 superfamilles de toxines et 20 superfamilles d'antitoxines (Leplae et al., 2011).

Enfin, le type V décrit un système TA où l'antitoxine agit également sous la forme d'une protéine. Le module GhoS/GhoT d'*E. coli* récemment décrit est représentatif de l'organisation des systèmes TA de type V (Wang et al., 2012). Dans ce système, l'antitoxine GhoS est une endoribonucléase ciblant l'ARNm de la toxine GhoT, empêchant ainsi la traduction de celle-ci (**Figure 26B**).

C. Les systèmes TA sans interaction directe entre toxine et antitoxine : le type IV

La particularité des systèmes TA de type IV est de ne pas présenter d'interaction directe entre la toxine et l'antitoxine. Le système YeeU/YeeV (également nommé CbeA/CbtA) d'*E. coli* illustre parfaitement ce mode d'organisation. La toxine bloque la polymérisation de protéines du cytosquelette MreB et FtsZ et l'antitoxine YeeU empêche l'action de la toxine YeeV en stabilisant les polymères de MreB et FtsZ (**Figure 27**). Un mode d'action similaire a également été rapporté pour un autre module d'*E. coli*, CptA/CptB (également appelé YgfX/YgfY) (Masuda et al., 2012).

En conclusion, les systèmes TA présentent une large diversité tant du point de vue de la nature de l'antitoxine et de son mode d'action sur la toxine, que du mode d'action de la toxine et de ses cibles moléculaires, ce qui permet au sein même des 5 types de système TA de définir des sous familles fonctionnelles.

Superfamille	Toxine	Antitoxine	Cible	Processus cellulaire
Ccd	CcdB	CcdA	ADN gyrase	Replication
HicBA	HicA	HicB	Clivage de l'ARN	
HipBA	HipA	HipB	Phosphorylation EF-TU	Traduction
MazEF (ChpA)	MazF (ChpAK)	MazE (ChpAI)	Clivage d'ARNm	Traduction
ParD (PemKI)	Kid (PemK)	Kis (PemI)	Clivage d'ARNm	Traduction
ParDE	ParE	ParD	ADN gyrase	Replication
Phd–Doc	Doc	Phd	Ribosome	Traduction
RelBE ¹⁾	RelE	RelB	Ribosome	Traduction
VapBC	VapC	VapB	Endoribonuclease	inconnu
MosAT	Most	MosA	inconnu	inconnu
YeeUV	YeeV	YeeU	inconnu	inconnu

Tableau 2 : Les différentes superfamilles des systèmes de type II à deux composants

Les 11 systèmes TA de type II. Les informations sur les familles de systèmes TA ont été collectées de la base de données TADB (<http://202.120.12.135/TADB2/index.php>).

1) La superfamille RelBE inclut cinq sous-familles : RelBE, HigBA, YefM-YoeB, YgiTU (MgsAR), et PrlF-YhaV

Les systèmes à trois composants ne sont pas décrits dans ce tableau (ex : epsilon/zeta)

IV. LES MODES D'ACTION ET LES CIBLES MOLECULAIRES DES TOXINES DES SYSTEMES TA

Les toxines des systèmes TA ont des cibles cellulaires variées comme les enveloppes bactériennes, la division cellulaire, la réplication de l'ADN et la traduction (**Figure 28**). Ces différentes activités cellulaires sont dûes à différentes cibles moléculaires.

A. L'altération de l'intégrité cellulaire

1. L'altération de la membrane bactérienne

Les toxines qui altèrent l'intégrité de la membrane plasmique appartiennent uniquement à des systèmes TA de type I et V. Chez les types I, les toxines sont majoritairement des petites protéines hydrophobes comprenant une hélice transmembranaire. En raison de leur forte hydrophobicité, elles peuvent s'enchâsser dans la membrane plasmique, former des pores qui déstabilisent le potentiel membranaire et entraîner une lyse cellulaire (**Figure 28 (1)**) (Goeders and Van Melderen, 2014). Il est à noter que ce mode d'action, illustré par la toxine SymE du système SymR/SymE d'*E. coli* (Kawano et al., 2007) rappelle celui de certains peptides antimicrobiens et n'est efficace qu'en présence d'une grande quantité de toxine. Le système GhoST de type V, entraîne lui aussi une altération de la membrane suite à la surproduction de la toxine GhoT qui conduit à la lyse cellulaire (Wang et al., 2012).

2. Les modifications du cytosquelette cellulaire et de la division cellulaire

La toxine YeeV de l'unique système TA de type IV caractérisé (YeeU/YeeV (CbeA-CbtA) chez *E. coli*) agit directement sur la morphologie cellulaire et la division en inhibant la polymérisation de MreB et FtsZ, impliquées dans la formation du cytosquelette et la division cellulaire. MreB et FtsZ sont des homologues à l'actine et à la tubuline des eucaryotes, qui sont impliquées dans la formation du cytosquelette et la division cellulaire (**Figure 28 (6)**) (Tan et al., 2011). *In vitro*, YeeV inhibe de façon ATP-dépendante la polymérisation de MreB et de façon GTP-dépendante celle de FtsZ. Cette toxine peut agir

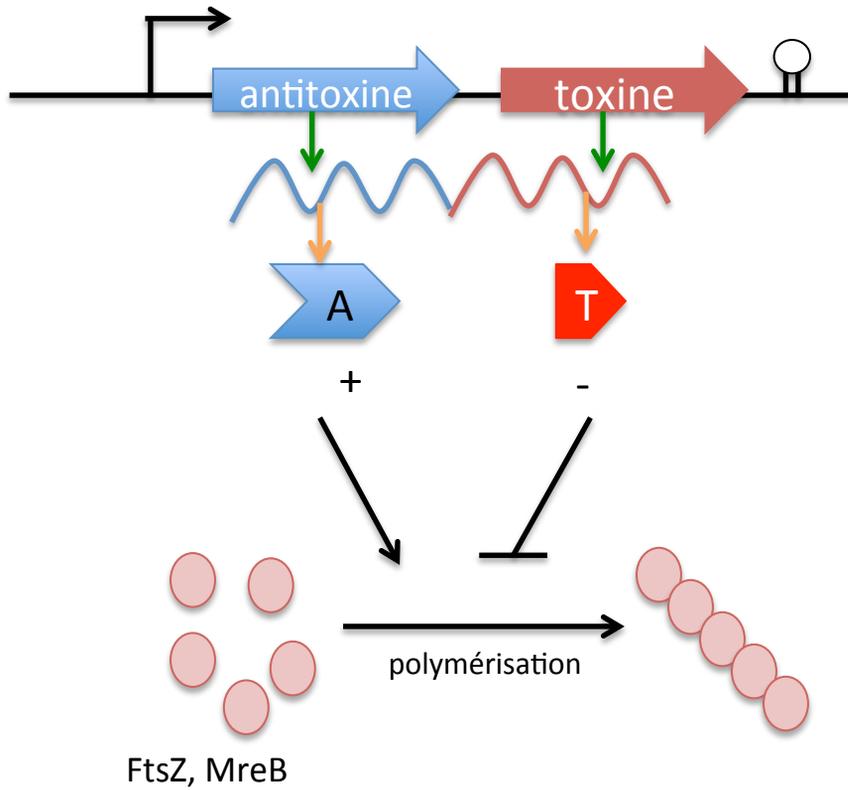


Figure 27 : L'organisation génétique des systèmes de type IV

La toxine inhibe la polymérisation de protéines du cytosquelette (FtsZ et MreB) alors que l'antitoxine bloque cet effet inhibiteur.

sur ses deux cibles protéiques en même temps et les deux activités sont compartimentées sur les parties N et C terminales de la protéine (Masuda et al., 2012).

3. L'action sur le peptidoglycane

Les toxines telles que PezT de l'opéron *pezAT* chez *Streptococcus pneumoniae*, appartenant à la superfamille zêta des systèmes TA de type II (PezAT est composé, à la différence des autres systèmes zêta à trois composants protéiques, de seulement deux composants), agissent en inhibant la synthèse de la paroi cellulaire (**Figure 28 (2)**). PezT possède une activité kinase et phosphoryle l'uridine diphosphate-N-acetylglucosamine (UNAG), un précurseur du peptidoglycane. L'UNAG phosphorylé bloque l'activité de MurA, enzyme catalysant la première étape de la biosynthèse du peptidoglycane, et interfère ainsi avec la synthèse de la paroi cellulaire (**Figure 29**). Cette inhibition entraîne une lyse cellulaire notamment sur les cellules en division rapide (Nariya and Inouye, 2008 ; Mutschler et al., 2010) alors que les cellules « en dormance » ou à croissance lente, survivent à l'action de PezT (**Figure 29**).

B. L'inhibition de la réplication de l'ADN

Les toxines plasmidiques de type II comme CcdB et ParE ont pour cible moléculaire l'ADN gyrase (**Figure 28 (7)**). L'ADN gyrase est une topoisomérase de classe II qui, en conformation ouverte, se complexe à l'ADN pour participer à la formation du double brin d'ADN lors de la réplication. L'action de ces toxines, présentes libres en grande quantité, sur la gyrase conduit à la formation d'un ADN double brin cassé entraînant une inhibition de la réplication et la mise en place d'un processus de mort cellulaire (Bernard and Couturier, 1992; Goeders and Van Melderen, 2014) (**Figure 30**).

C. La répression de l'expression génique

1. L'inhibition de la traduction

Les toxines les plus abondantes appartiennent au type II et ont pour mode d'action majoritaire une inhibition de la traduction par clivage de l'ARN. Ces toxines, également

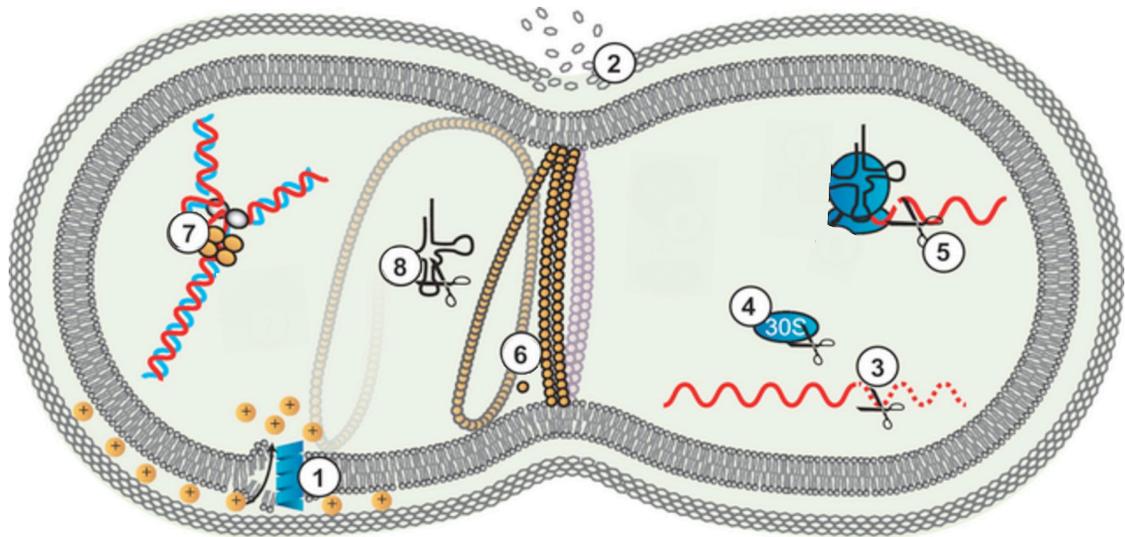


Figure 28 : Les différentes cibles des toxines des systèmes TA

Schéma représentant les cibles cellulaires des systèmes TA. La cellule bactérienne schématisée comprend une membrane et une couche de peptidoglycane mais d'autres composants comme l'enveloppe cellulaire ont été volontairement omis pour simplifier le schéma. Les cibles sont numérotées de 1 à 8.

- 1: Altération de la membrane (type V et I)
- 2: Inhibition de la synthèse de la paroi cellulaire (superfamille zêta des TA de type II)
- 3: Clivage d'ARNm ribosome indépendant
- 4: Clivage d'ARNr
- 5: Clivage d'ARNm ribosome dépendant
- 6: Déstabilisation de la polymérisation de FtsZ et de MreB (type IV)
- 7: Inhibition de l'ADN gyrase
- 8: Clivage d'ARNt

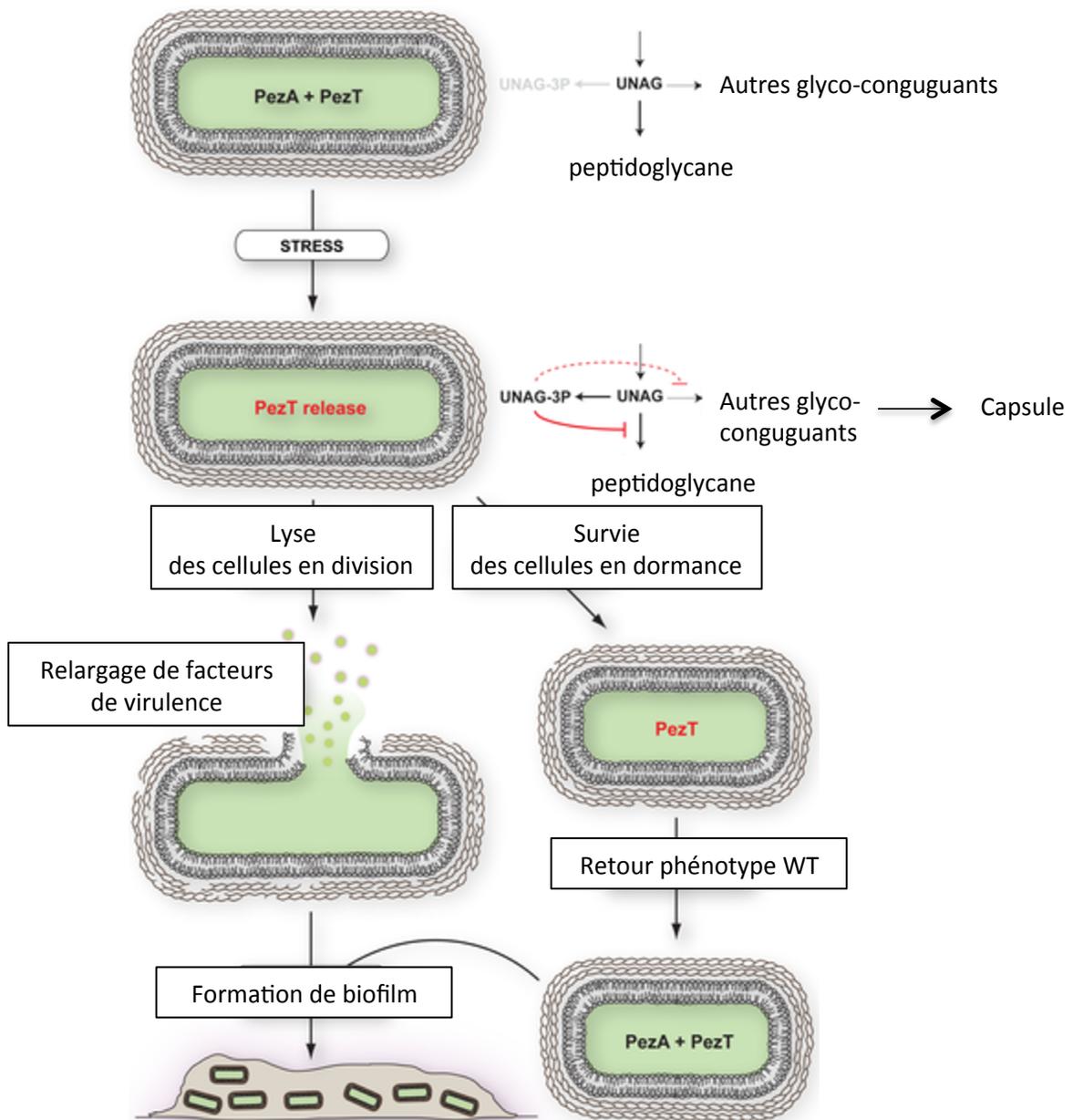


Figure 29 : Le système TA PezAT de *Streptococcus pneumoniae*

En condition de stress la dégradation de l'antitoxine PezA et la libération de la toxine PezT convertit le pool cellulaire de UNAG en UNAG-3P, ce qui conduit à l'inhibition de la synthèse du peptidoglycane. Métaboliquement, les cellules en dormance ou à croissance lente survivent au relargage de PezT. En revanche, les cellules à division rapide sont soumises à une lyse cellulaire et à la libération de facteurs de virulence. En outre, l'autolyse partielle et l'inhibition générale de la synthèse de polysaccharides capsulaires par UNAG-3P vont favoriser la formation de biofilm. Les cellules survivant au relargage de PezT finiront par retrouver un comportement normal par production de PezA, en absence de stress.

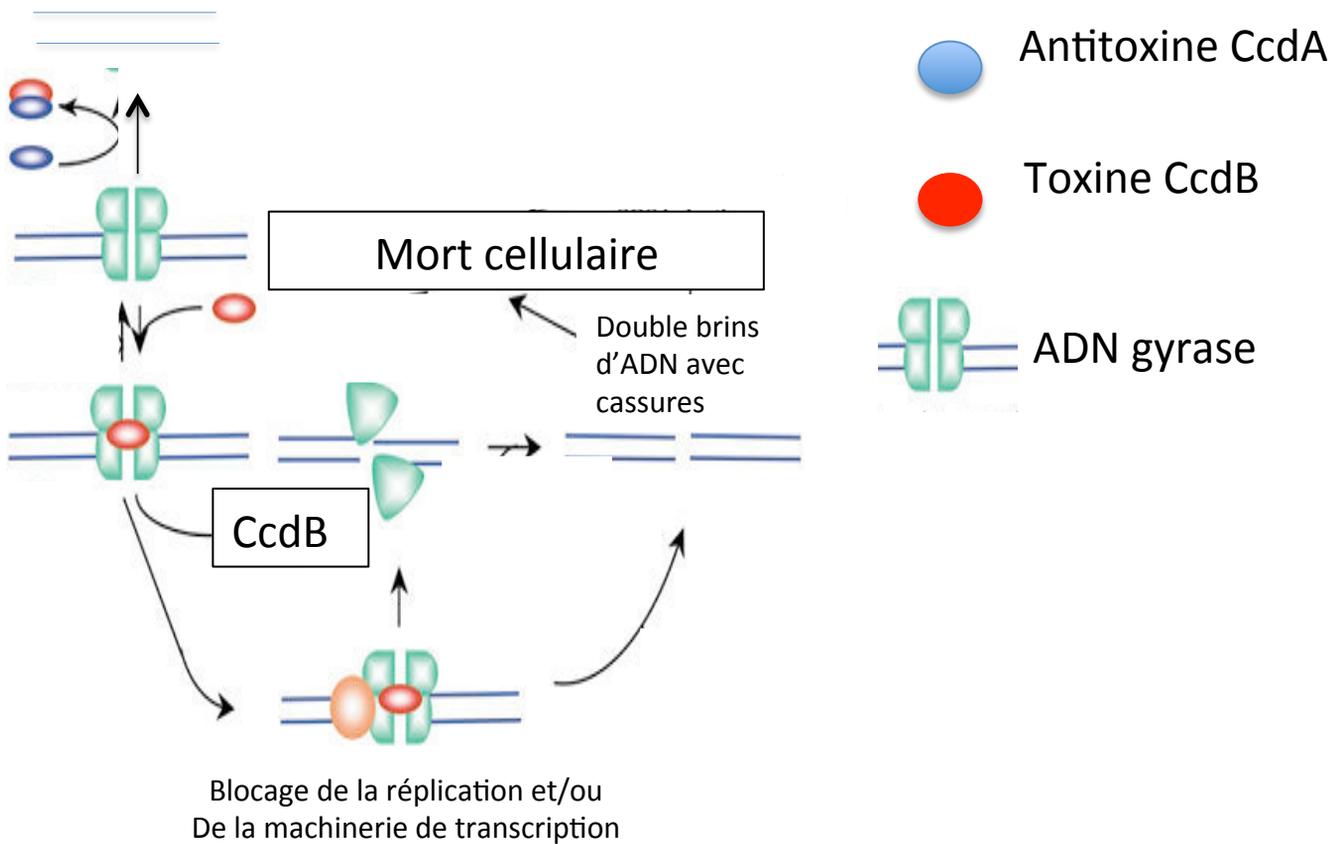


Figure 30 : Rôle des toxines sur la réplication de l'ADN : ADN gyrase ciblée

L'ADN gyrase est une topoisomérase de type II qui rentre en jeu dans la réplication de l'ADN. La toxine CcdB présente libre en grande quantité inhibe l'action de l'ADN gyrase, laissant des cassures dans le brin d'ADN. Ces cassures entraînent ainsi la mise en place par la cellule d'un processus de mort cellulaire

appelées ARN interféras, ciblent soit l'ARNm associé au ribosome soit l'ARNm libre, l'ARNt ou bien encore l'ARNr (**Figure 28 (4)**).

2. Les ARN interféras dépendantes des ribosomes

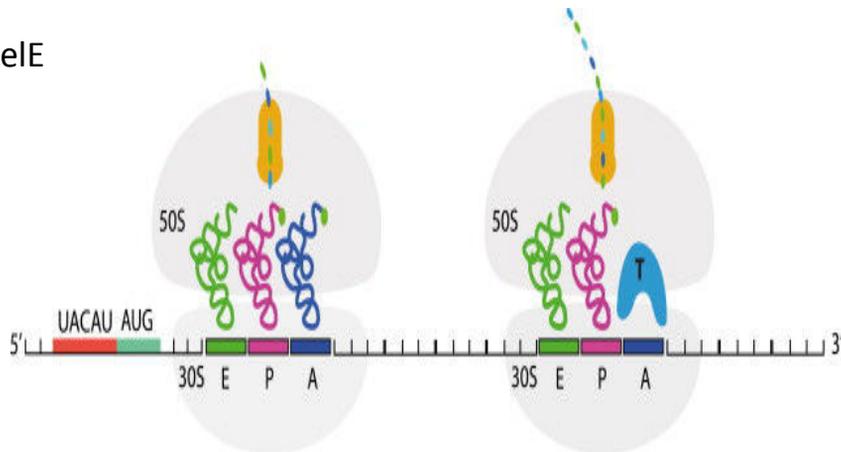
Les toxines de système TA qui présentent une activité de type ARN interférase dépendante des ribosomes clivent l'ARNm à des sites spécifiques uniquement en présence du ribosome (**Figure 28 (5)**).

Le système RelBE d'*E. coli* est le plus étudié des modules TA à activité ARN interférase ribosome dépendante. La toxine RelE s'associe au site A du ribosome et clive l'ARNm. De nombreux homologues de RelE ont été trouvés chez différentes espèces de Bacteria et Archea (Neubauer et al., 2009). Ainsi, *E. coli* contiendrait au moins 7 loci de type RelBE (Christensen-Dalsgaard et al., 2010) dont le système YefM/YoeB particulièrement bien caractérisé. Il a ainsi été démontré que la toxine YoeB s'associe à la sous-unité 50S du ribosome au niveau du site A et bloque spécifiquement l'initiation de la traduction en clivant l'ARNm au niveau du codon initiateur (Zhang et al., 2009 ; Kamada and Hanaoka, 2005).

3. Les ARN interféras indépendantes du ribosome

La toxine MazF d'*E. coli* représente la première ARN interférase ribosome indépendante caractérisée biochimiquement (**Figure 28 (3)**). Cette toxine clive les ARNm au niveau de sites de reconnaissance « ACA ». (Zhang et al., 2005). Alors qu'*E. coli* ne possède qu'un seul module MazEF, au moins sept homologues de la toxine ont été trouvés chez *M. tuberculosis*. L'activité endoribonucléase site-spécifique d'au moins quatre de ces toxines de *M. tuberculosis* (MazF-mt1, MazF-mt3, MazF-mt6 et MazF-mt7) a été démontrée (Zhu et al., 2008). Chacune présente une spécificité de clivage différente avec une reconnaissance de séquences consensus de trois à cinq bases : MazF-mt1 clive préférentiellement l'ARNm entre U et A dans un triplet UAC ; MazF-mt6, une région riche en U dans la séquence consensus dégrénerée 5'-(U/C)U↓ (A/U)C(U/C)-3' ; MazF-mt3 clive l'ARNm au niveau de séquences 5'-UU↓ CCU-3' et MazF-mt7, au niveau des séquences 5'U ↓CGCU-3'. Récemment, il a été montré que l'ARN ribosomal pouvait être également ciblé par les toxines MazF. Notamment parmi les toxines décrites précédemment, MazF-mt6 est capable de cliver la séquence 5'-UUCCU-3' de l'ARN 23S et la toxine MazF-mt3 peut cliver la

A. RelE



B. MazF

C. VapC20 *M. tuberculosis*

D. VapC *S. flexneri*

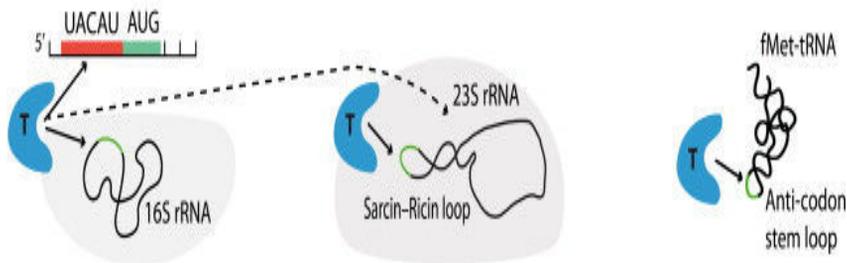


Figure 31 : Les ARN cibles moléculaires des toxines

- (A) Exemples de toxines à activité endoribonucléase régulant directement la traduction. L'ARNt se fixe aux sites A, P et E des ribosomes. Chez *E. coli*, RelE peut se fixer sur le site A de fixation au ribosome et cliver l'ARNm après le deuxième nucléotide du site A du codon.
- (B) La toxine MazF de *B. subtilis* clive l'ARNm à une séquence 5'-UACAUAUG-3' en 5' du codon d'initiation AUG. Les toxines MazF de *M. tuberculosis* clivent non seulement l'ARNm mais, certaines d'entre elles, clivent également l'ARNr 23S et/ou 16S.
- (C) La toxine VapC20 de *M. tuberculosis* clive spécifiquement l'ARNr 23S au niveau d'une conformation en tige boucle.
- (D) La toxine VapC de *Shigella flexneri* clive l'ARNt N-formyl méthionine au niveau de la boucle de l'anti-codon.

séquence 5'-UCCUU-3' de l'ARNr 23S et de l'ARNr 16S. Les toxines MazF pourraient ainsi avoir une importante diversité de cibles moléculaires (Schifano et al., 2013)(**Figure 31**).

Les toxines VapC des systèmes TA de type II de la superfamille VapBC représentent un deuxième groupe d'ARN interférase ribosome indépendantes. L'activité RNase de ces toxines est portée par un domaine PIN, domaine protéique d'environ 130 acides aminés, appelé ainsi suite à l'identification à l'extrémité N-terminale de la protéine PilT. Le domaine PIN est retrouvé dans de nombreuses protéines tant eucaryotes que procaryotes. Chez les eucaryotes, les domaines PIN sont retrouvés dans des protéines à multi domaines impliquées dans la dégradation des ARNm non sens ou dans la maturation de l'ARNr 18S. Chez les procaryotes, les protéines à domaine PIN sont quasi exclusivement des toxines VapC qui, du fait de leur petite taille, peuvent, en fait, plus simplement être assimilées à un domaine PIN. Les séquences primaires des domaines PIN ne présentent que peu de similitudes entre elles. En revanche, ces domaines disposent d'une structure tridimensionnelle caractéristique, compacte, constituée de feuillets β et hélices α formant une structure en « clip » et contenant 3 à 4 acides aminés conservés nécessaires à la catalyse (**Figure 32A**). En effet, ces résidus forment une poche acide stabilisant un ion divalent (Mg^{2+} ou Mn^{2+}) définissant ainsi le site actif de l'enzyme (configuration RNaseH like) (**Figure 32B, C**).

L'existence de domaines PIN, et donc de toxines VapC, a été prédite dans plus de la moitié des génomes procaryotes dont la séquence est disponible et notamment chez de nombreux micro-organismes pathogènes. La compréhension de la fonction et du mécanisme d'action des toxines VapC représentent aujourd'hui un sujet d'étude en plein essor. *M. tuberculosis*, l'un des pathogènes humains les plus dévastateurs, possède pas moins de 45 systèmes VapBC. Aussi, la compréhension du rôle et du mode d'action de ces toxines fait l'objet, chez cette bactérie en particulier, de très nombreuses études (Ahidjo et al., 2011; Arcus et al., 2011; McKenzie et al., 2012; Min et al., 2012).

Néanmoins, la caractérisation fonctionnelle des VapC reste aujourd'hui encore relativement faible (Daines et al., 2007; Miallau et al., 2009; Ramage et al., 2009; Robson et al., 2009; Ahidjo et al., 2011; Arcus et al., 2011), mais leur activité ribonucléasique séquence-spécifique est communément admise (**Figure 32C**). Toutefois, les cibles moléculaires des VapC *in vivo* demeurent dans la majorité des cas méconnus. Récemment, la spécificité de reconnaissance de séquences de 4 protéines VapC (VapC_{P_{AE}0151}(GG(U/G)G) et VapC_{P_{AE}2754} (GG(U/G)G) de *Pyrobaculum aerophilum* et VapC_{RV0065} ((G/C)G(G/C)(G/C/A)) et VapC_{RV0617} ((G/C)G(G/C)(G/C/A)) de *Mycobacterium tuberculosis*) a été déterminée (McKenzie et al., 2012). En raison du pourcentage élevé en G+C chez ces deux organismes,

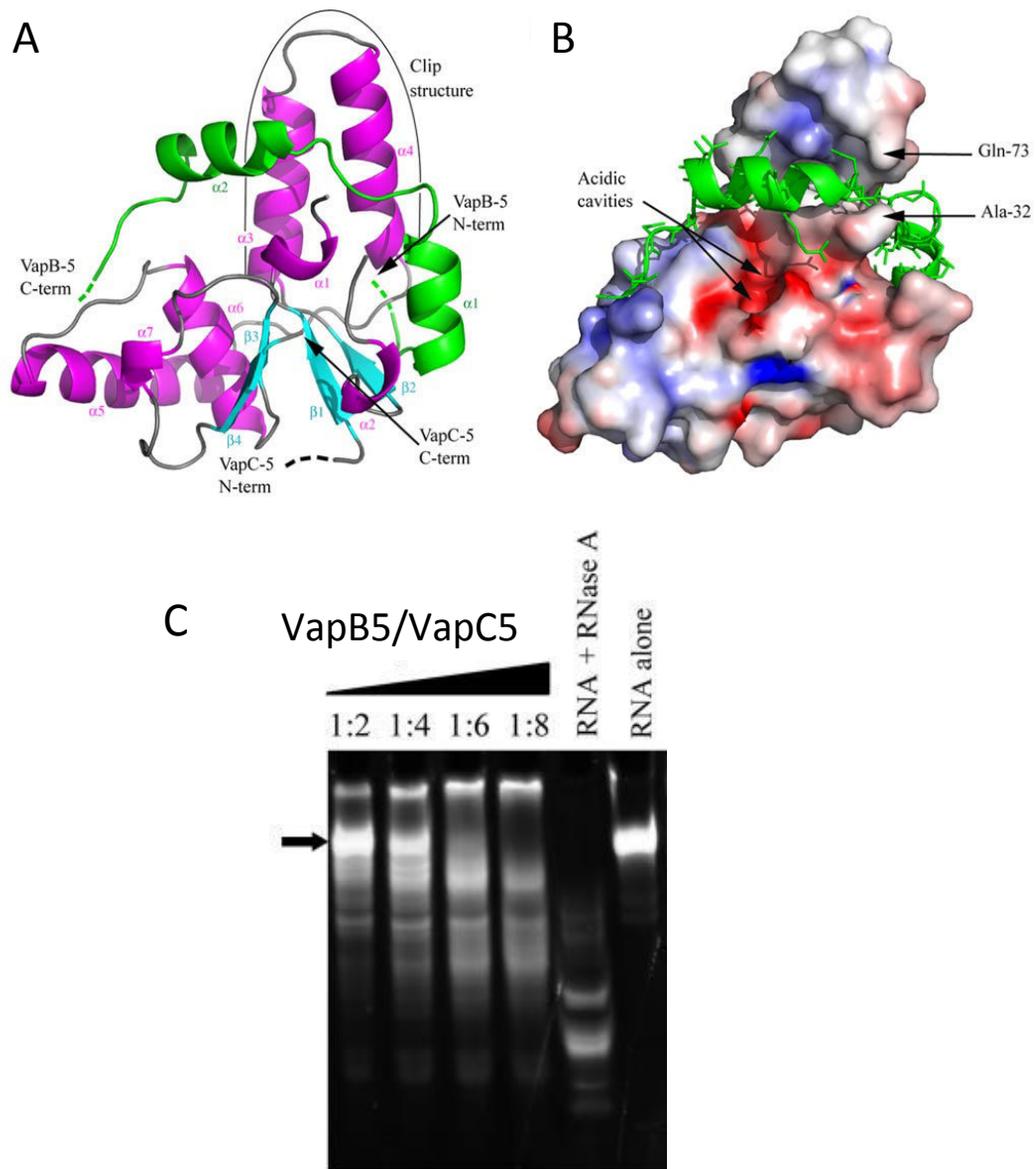


Figure 32 : La toxine VapC-5 de *Mycobacterium tuberculosis* : structure et activité RNase

- (A) Structure du complexe VapBC-5. Les hélices α de VapC-5 et VapB-5 sont représentées en rose et en vert, respectivement.
- (B) Représentation en surface de VapC-5, montrant le potentiel électrostatique négatif (en rouge) et positif (en bleu). VapB-5 est représentée comme un diagramme en ruban vert, avec des chaînes latérales d'acides aminés représentées sous forme de bâton. Les flèches noires désignent la cavité qui abrite les résidus du site actif. Les résidus qui peuvent être impliqués dans la liaison des ions Mg^{2+} sont indiqués (Gln73 et Ala32).
- (C) Activité ribonucléase *in vitro* : gel dénaturant montrant, de gauche à droite, la dégradation d'un ARN de référence avec l'augmentation progressive de la concentration en VapC5/VapB5. La RNase A est utilisée comme témoin positif et l'ARN seul comme témoin non dégradé. La flèche noire indique l'ARN intact.

la fréquence des séquences cibles est supposée importante. Les auteurs proposent donc pour ces toxines un rôle non spécifique sur la régulation de l'expression des gènes via la dégradation de nombreux ARNm. De façon originale, il a été démontré que certaines VapC (VapC_{LT2} de *Salmonella enterica* et VapC_{MVP1} de *Shigella flexneri 2a*) clivent de façon spécifique l'ARNt initiateur (ARNt^{fMet}) au niveau de la boucle de l'anticodon et inhibent ainsi de façon efficace la traduction de façon globale (Winther and Gerdes, 2011) (**Figure 31**). Enfin, la toxine VapC20 de *Mycobacterium tuberculosis* inhibe la traduction par clivage de l'ARNr 23S au niveau de la tétraboucle de l'hélice (Winther et al., 2013). Cette structure, également appelée « Sarcin Ricin Loop (SRL) », universellement conservée, est la cible de plusieurs toxines telles que la sarcine ou la ricine. Le même site de clivage est conservé pour l'ensemble de ces trois toxines, qu'elles soient procaryote ou eucaryote (**Figure 31**).

Ainsi, les toxines VapC semblent avoir différents modes de clivage et différentes cibles moléculaires ARN (ARNm, ARNt, ARNr), traduisant ainsi une diversité au sein de cette famille de systèmes TA.

V. La régulation de l'expression des systèmes TA de type II

Les systèmes TA de type II étant les plus représentés et les plus étudiés, leur régulation est de loin la mieux caractérisée. Pour la suite de cette introduction, et en relation avec le travail de thèse, nous nous consacrerons donc plus particulièrement à ce type de système TA.

A. La régulation transcriptionnelle : motif de liaison à l'ADN de l'antitoxine

Les opérons TA de type II sont transcriptionnellement autorégulés par leur propre complexe TA qui se lie à un ou plusieurs opérateurs de la région promotrice. Bien que les domaines de liaison à l'ADN soient portés par l'antitoxine, dans la majorité des cas, la présence de la toxine est nécessaire pour augmenter l'affinité de la liaison de l'antitoxine à l'ADN (**Figure 33**). La toxine agit donc ici comme un co-répresseur. Les domaines de liaison à l'ADN sont situés en général dans la région N-terminale de l'antitoxine. Quatre familles différentes de domaines de liaison à l'ADN peuvent être retrouvées chez les antitoxines (**Figure 34**) : le domaine Hélice-Tour-Hélice (HTH, ex : HigA), le domaine Ruban-Hélice-Hélice (RHH, ex : CcdA, RelB, FitA), le domaine AbrB (= boucle-charnière-hélice (LHH) ; ex : mazE) et le domaine de type Phd/YefM (Gerdes et al., 2005). La famille à domaine AbrB,

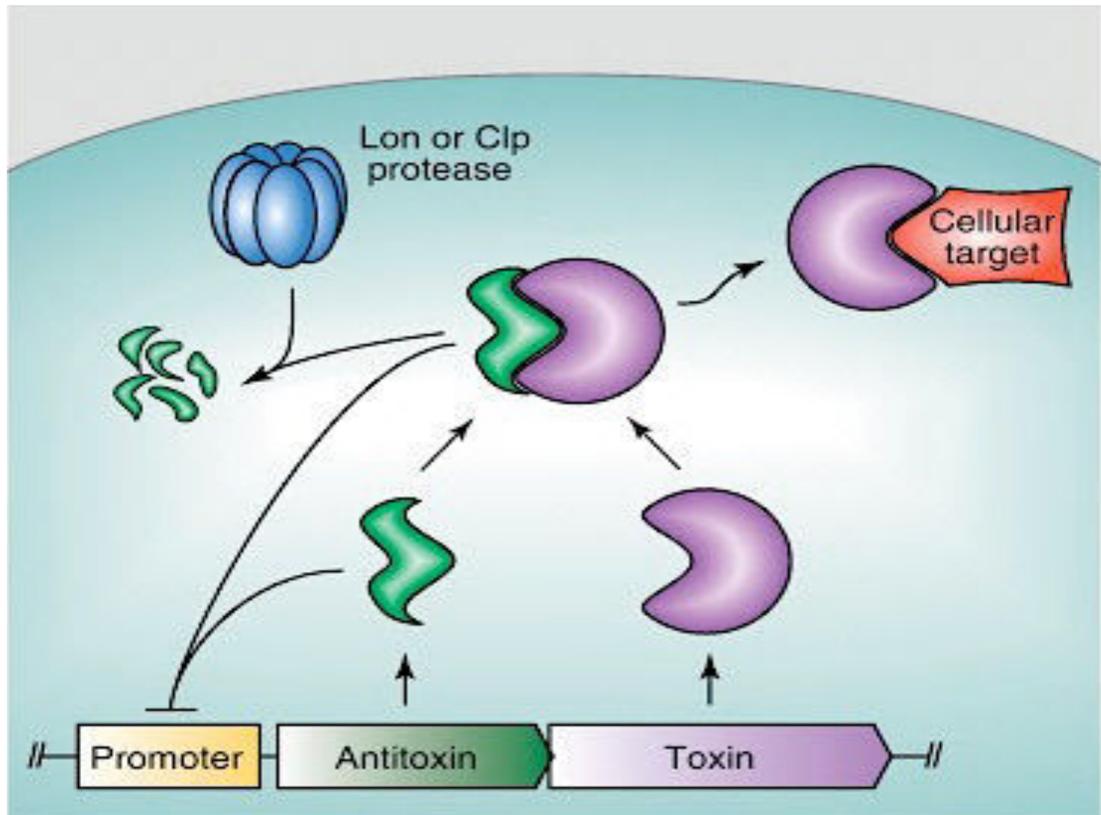


Figure 33 : Régulation de l'expression des systèmes TA de type II

Schéma de régulation d'un système de type II. Après co-transcription et production des deux protéines, Toxine et Antitoxine, le complexe protéique TA se forme. Ce complexe est capable, grâce à l'antitoxine, de se fixer sur l'ADN au niveau de la région promotrice pour autoréguler de façon négative l'expression de l'opéron. Dans une moindre mesure, et avec une faible affinité, l'antitoxine seule peut également se lier à ses sites opérateurs. En situation de stress, l'antitoxine est dégradée par les protéases ATP dépendantes (type Lon et ClpX chez *E. coli*). La toxine se retrouve alors libre d'agir sur ses cibles cellulaires. Le complexe protéique n'étant plus formé et l'antitoxine étant dégradée, l'expression de l'opéron n'est alors plus régulée négativement.

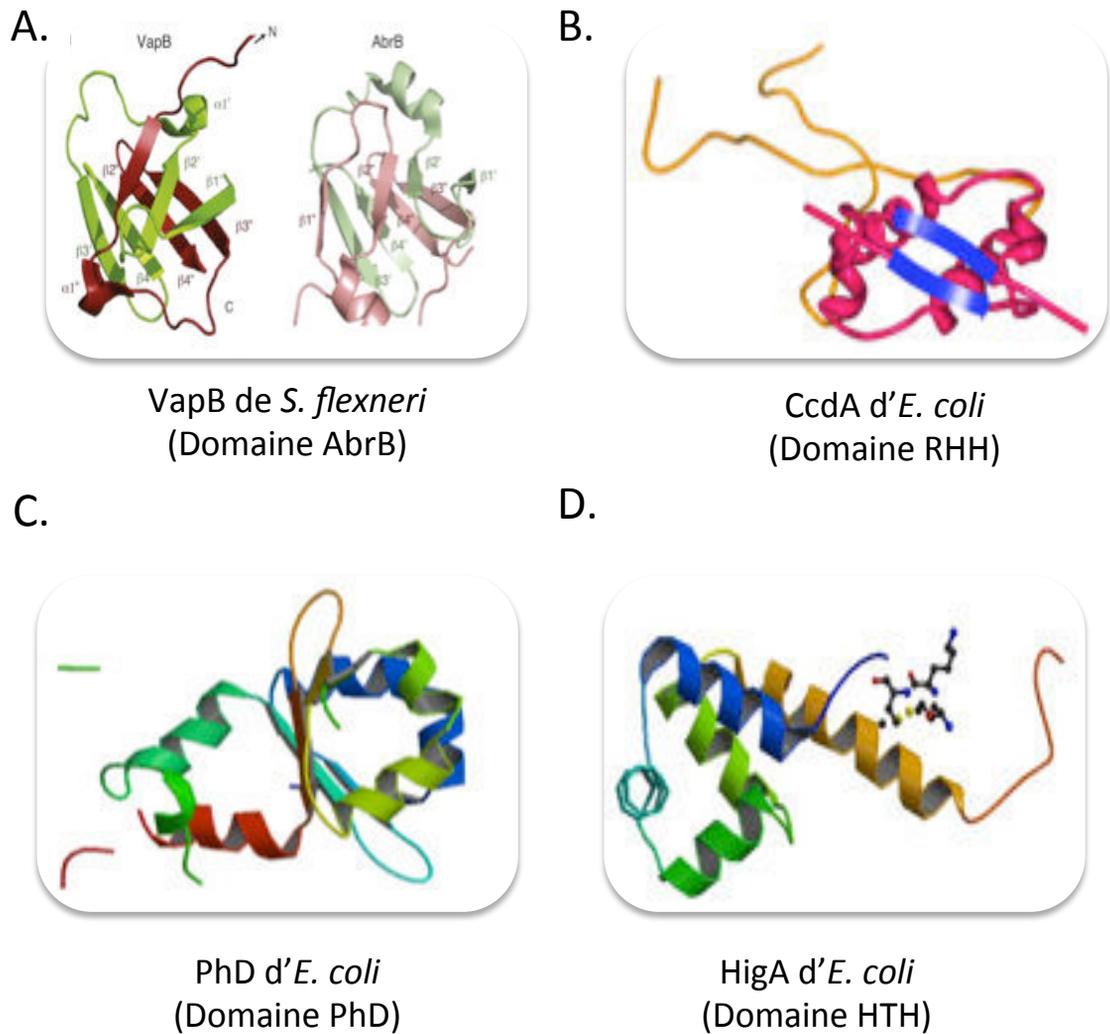


Figure 34 : Les différentes familles d'antitoxine basées sur leur structure tridimensionnelle et leur domaine de liaison à l'ADN

(A) L'antitoxine VapB, décrite chez *S. flexneri*, possède un domaine de liaison à l'ADN de type AbrB. A gauche : le domaine de liaison à l'ADN dans l'antitoxine VapB résulte de l'homodimérisation de deux domaines N-terminaux (rouge et vert). A droite : le domaine de liaison à l'ADN homologue retrouvé chez *B. subtilis* (AbrB). L'annotation des éléments de structure secondaire pour VapB suit la norme utilisée pour AbrB (Dienemann C. *et al.*, 2011)

(B) L'antitoxine CcdA contient un domaine de type RHH (rouge et bleu) de fixation à l'ADN

(C) L'antitoxine Phd du système TA Phd-Doc d'*E. coli* (Garcia Pino A. *et al.* 2015) possède un domaine Phd

(D) L'antitoxine HigA d' *E. coli* possède un domaine HTH.

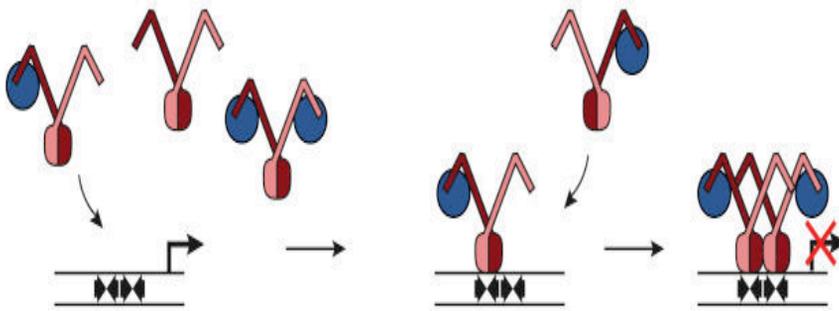
En (C) et (D), un gradient de couleur est utilisé du domaine N au C terminal des protéines (Arbing M. A *et al.* 2010)

contenant notamment l'antitoxine MazE du système MazEF d'*E. coli*, est, à ce jour, la mieux décrite. Grâce à des études de diffraction aux rayons X, il a pu être démontré que le domaine C terminal, intrinsèquement désordonné, adopte, lors de la liaison à la toxine MazF, une conformation unique, généralement prolongée, permettant sa protection face au clivage des protéases (Zorzini et al., 2015). Le mode de liaison à l'ADN, initialement caractérisé sur la protéine AbrB de *Bacillus subtilis* (Protéine B résistante aux Antibiotiques) est aujourd'hui retrouvé chez de nombreux régulateurs transcriptionnels de différentes espèces bactériennes tels que SpoVT de *B. subtilis* ou des antitoxines de modules d'addiction comme MazE chez *E. coli* ou encore des antitoxines de type VapB comme l'antitoxine NtrP du module NtrRP de *S. meliloti* (Bodogai et al., 2006). Le système VapBC de *Shigella flexneri*, bien décrit pour sa structure par cristallographie, montre que l'antitoxine VapB possède un domaine de type AbrB-like très proche de SpoVT. Les sites de liaison à l'ADN ont ainsi pu être mis en évidence (**Figure 34**).

Ce mécanisme général de régulation de la transcription de l'opéron par le complexe Antitoxine/Toxine est finement modulé par le ratio Antitoxine/Toxine (R) suivant un mécanisme nommé « coopérativité conditionnelle » (**Figure 35**). Ainsi, dans le cas par exemple du système RelBE, un excès d'antitoxine RelB par rapport à la toxine RelE ($R > 1$) favorise la formation d'hétérotrimères ((RelB₂)(RelE)). Ce complexe présente une forte affinité pour les deux régions opératrices (*relO*) du promoteur et la liaison coopérative de 2 hétérotrimères conduit à une forte répression de la transcription. A l'inverse, un excès de toxine RelE ($R < 1$) favorise la formation d'hétérotétramères ((RelB₂)(RelE₂)), incapables de se lier à l'opérateur *relO*. La répression est alors levée. Le ratio RelB/RelE contrôle donc bien le taux de transcription de l'opéron *relBE*. Cette régulation par coopérativité conditionnelle semble jouer un rôle important dans la stabilisation du niveau d'antitoxine intracellulaire au cours de la croissance bactérienne rapide et minimiser aussi le risque d'induction aléatoire de l'expression de l'opéron *relBE*. Un mécanisme similaire de coopérativité conditionnelle a été démontré pour la régulation de la transcription d'autres systèmes TA de type CcdAB, Phd/Doc (Magnuson and Yarmolinsky, 1998) et VapBC (Winther and Gerdes, 2012b).

En conclusion, les systèmes TA sont soumis à une autorégulation négative exercée par le complexe TA lui-même et de manière forte par le complexe A/T. Les deux gènes étant co-transcrits, le déséquilibre du ratio est conditionné par l'instabilité et la dégradation de

A. Croissance cellulaire rapide : ratio RelE/RelB élevé, répression aux sites opérateurs *relO*



B. Carence nutritionnelle : ratio RelB/RelE bas, levée de répression aux sites *relO*

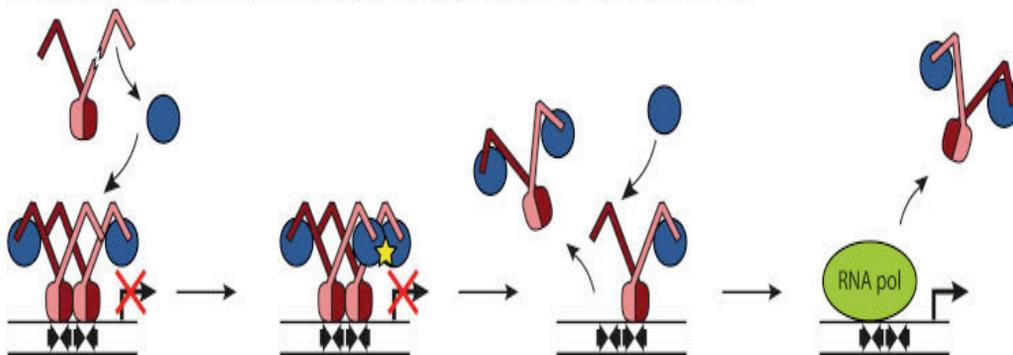


Figure 35 : Le complexe TA RelBE : un modèle de coopérativité conditionnelle pour la fixation à l'ADN

(A) Dans les cellules à croissance rapide, l'antitoxine RelB est en excès et le trimère de $((\text{RelB}_2)(\text{RelE}))$ se lie d'abord à l'opérateur *relO*. La liaison du trimère favorise fortement la liaison d'un second trimère, conduisant à une liaison à deux sites adjacents sur l'ADN

(B) Au cours de la carence nutritionnelle, les quantités de toxine RelE augmentent à mesure que RelB labile est dégradée. RelE libre se lie alors à l'extrémité C terminale de RelB dans le trimère lié à l'ADN, entraînant la libération de l'hétérotétramère $((\text{RelB}_2)(\text{RelE}_2))$ ainsi formé, du site *relO*. Le trimère restant sur l'ADN lie également une seconde molécule de RelE et se retrouve alors également libéré ou déplacé par l'ARN polymérase. La toxine RelE est représentée en bleu et l'antitoxine RelB en rouge/rose.

Extrait de : Boggild A., *et al.* 2012

l'antitoxine dans certaines conditions de « stress ». La régulation post-traductionnelle due à l'action des protéases sur l'antitoxine joue un rôle majeur pour « libérer » la toxine.

B. La dégradation des antitoxines par les protéases

Les protéases sont impliquées dans la régulation post-traductionnelle de l'expression des systèmes TA en ciblant, spécifiquement et sous certaines conditions, des antitoxines particulières. Chez *E. coli*, les protéases ATP-dépendantes de type Lon et ClpX sont respectivement responsables de la dégradation des antitoxines CcdA et MazE (Van Melderen et al., 1994 ; Aizenman et al., 1996). La régulation de l'expression des opérons *relBE* et *mazEF* d'*E. coli* a été particulièrement bien décrite. Il a ainsi été montré que la protéase Lon est impliquée dans la dégradation de l'antitoxine RelB en condition optimale de croissance et dans celle des antitoxines RelB et MazE, en condition de carence en acides aminés (Christensen et al., 2003; Christensen et al., 2004).

D'autre part, la surproduction de la protéase Lon chez *E. coli* est connue pour être létale (Goff and Goldberg, 1987). Ceci suggère qu'une ou plusieurs des protéines cibles de Lon sont essentielles à la survie de la bactérie. Une étude a permis de montrer que la surproduction de Lon entraîne une inhibition de la traduction qui passe par au moins deux voies. Une de ces voies a été identifiée comme étant dépendante du système TA YoeB-YefM. En effet, parmi les cinq systèmes TA d'*E. coli* invalidés (*relBE*, *mazEF*, *chpB*, *dinJ-yafQ* et *yefM-yoeB*), seul le mutant de délétion *yefM-yoeB* présente un phénotype de létalité moins important après surproduction de Lon que celui de la souche sauvage. L'existence d'une deuxième voie est montrée par le fait que la délétion de ce module ne supprime pas complètement l'effet de Lon sur la létalité de la bactérie résiduelle (Christensen et al., 2004).

Les protéases jouent donc un rôle important dans la dégradation des antitoxines, ce qui suggère que l'activation de ces protéases par des conditions particulières est primordiale. Ce phénomène n'explique pas à lui seul, les régulations différentes de l'expression des différents systèmes TA présents dans une bactérie, si les antitoxines de ces systèmes sont soumises à la dégradation par une protéase commune (Ramage et al., 2009).

C. Les régulations croisées des systèmes TA

L'interaction toxine/antitoxine est généralement spécifique à l'intérieur d'un module donné et ce, malgré l'existence de systèmes TA très homologues dans le génome d'une

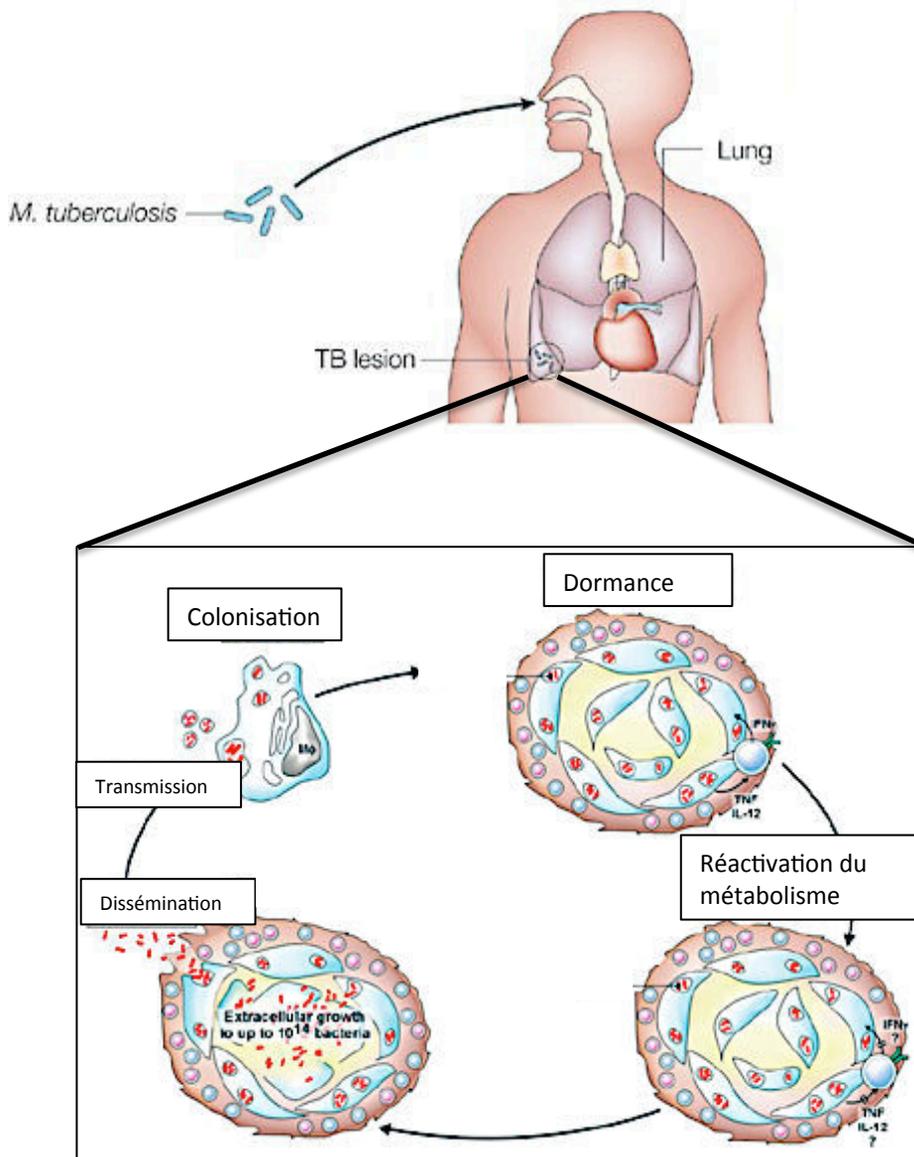


Figure 36 : Schéma du cycle infectieux de *Mycobacterium tuberculosis*

La colonisation des macrophages des alvéoles pulmonaires est la première étape de l'infection. Ensuite, la formation d'un « granuloma tuberculosis » (accumulation de macrophages créant un état inflammatoire) apparaît et des signaux de stress, comme un stress oxydatif, induisent un état de dormance chez la bactérie. Après un signal, ces bactéries réactivent leur métabolisme, et se multiplient, et se disséminent à nouveau.

Adapté de: Ulrich and Kaufmann 2006

bactérie donnée. Ainsi, chez *M. tuberculosis* par exemple, aucune interaction croisée protéine-protéine n'a été observée entre les 30 systèmes de la famille VapBC (Ahidjo et al., 2011).

Toutefois, quelques exemples d'interactions croisées entre systèmes homologues ou non homologues ont été mis en évidence. Chez *M. tuberculosis*, les trois différents homologues RelBE sont capables de se fixer aux régions promotrices des opérons codants ces systèmes, suggérant donc la possibilité d'une co-régulation négative de l'expression de des différents systèmes *in vivo* (Yang et al., 2010). Chez cette même bactérie, il a d'autre part été démontré que deux toxines MazF (MazF-mt1 et MazF-mt3) pouvaient physiquement interagir avec des antitoxines appartenant à la famille VapB et qu'inversement, des toxines VapC pouvaient interagir avec des antitoxines MazE. Ces interactions sont suffisamment fortes pour obtenir, lors d'expériences de co-expression chez *E. coli*, une réversion de l'effet toxique exercée pour une toxine par l'antitoxine d'un système TA de familles différentes. (Zhu et al., 2010).

Aussi, l'existence de réactions croisées entre différents systèmes TA tant au niveau protéine-protéine, qu'au niveau transcriptionnel ne peut donc pas être exclue et pourrait permettre de moduler de manière globale la traduction des gènes sous contrôle des systèmes TA lors d'un stress environnemental perçu par la bactérie. Cette réaction croisée devra donc être prise en considération lors de l'analyse de souches mutantes pour un système TA.

D. Les signaux d'induction de l'expression des systèmes TA (exemple chez *M. tuberculosis*)

Une explication possible du maintien d'un nombre important de systèmes TA différents chez *M. tuberculosis* (88 systèmes TA) serait dû au fait qu'ils répondent, de façon spécifique, à des signaux différents. Cette multitude de signaux peut être rencontrée par la bactérie dans les différents environnements et niches qu'elle peut occuper (Ramage et al., 2009). Dans un environnement hostile où la bactérie subit un certain nombre de stress variés, la diversité des TA pourrait permettre de répondre à ces différents stress. Suivant cette hypothèse, des travaux ont porté sur l'analyse de l'expression des TA de *M. tuberculosis*. Cette bactérie pathogène de l'homme, transmise par aérosol, est largement, sinon exclusivement, retrouvée dans les cellules phagocytaires des poumons (macrophages, neutrophiles, monocytes et cellules dendritiques). Ces cellules présentent un environnement hostile (hypoxie, pH acide, stress oxydatif) ne permettant normalement pas la survie d'une bactérie dans un phagosome (vacuole d'endocytose de cellule phagocytaire) (**Figure 36**) (Ernst, 2012). Des études réalisées chez la souris ont permis de montrer que,

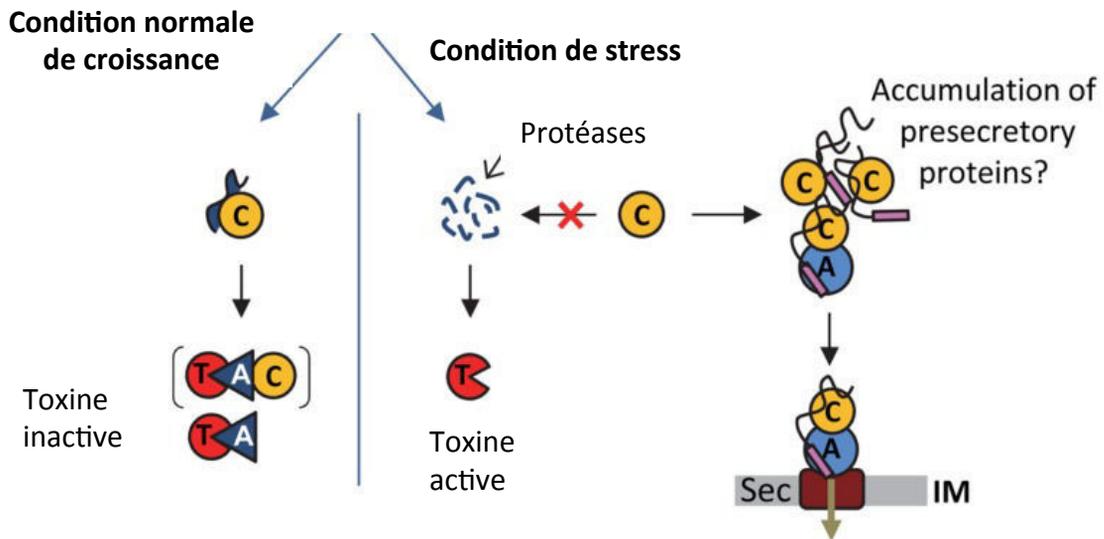


Figure 37 : Le système TA de type TAC

Schématisation d'un modèle proposé pour la fonction de la chaperonne du système TAC de *M. tuberculosis* (Rv1957) dans le contrôle du système TA. Les différentes protéines sont représentées comme suit: la toxine (T, rouge), l'antitoxine (A, triangle bleu), la protéine chaperonne Rv1957 (C, jaune), SecA1 (A, rond bleu), SecYEG (Sec, marron). IM signifie membrane interne. La séquence signal de protéines pré-sécrétées est montrée en violet. Les parenthèses indiquent qu'on ne sait pas encore si la protéine chaperonne fait partie du complexe TA inactif. La croix rouge indique que, dans certaines conditions de stress, le chaperon pourrait être recruté pour sauver l'accumulation des protéines pré-sécrétées. Dans ce cas, le chaperon ne serait plus disponible pour protéger l'antitoxine de la dégradation par des protéases et faciliter son interaction avec la toxine, provoquant ainsi l'activation de la toxine et l'inhibition de la croissance bactérienne jusqu'à un retour à un état normal.

même lorsque des réponses immunitaires adaptatives sont suffisantes pour arrêter la croissance bactérienne, la capacité des cellules à éliminer *M. tuberculosis* est limitée. Une sous-population de bactéries continue à survivre et parfois à se reproduire au cours de ce stade chronique. Les bactéries sont dans un état de type « dormance » pour échapper au système immunitaire de l'hôte et survivre de manière intracellulaire. Afin de développer de nouvelles thérapies, des études récentes se concentrent particulièrement sur le rôle des systèmes TA dans la survie de *M. tuberculosis* (Ramage et al., 2009 ; Winther et al., 2013 ; Winther and Gerdes, 2012). L'analyse, par RT-PCR quantitative de l'expression de systèmes TA a permis de montrer une stimulation de l'expression de 30 de ces systèmes lors d'un stress hypoxique (condition rencontrée par la bactérie phagocytée par le macrophage) et pour 23 d'entre eux par un traitement par l'interféron γ (IFN- γ). Deux systèmes sont spécifiquement exprimés en réponse à l'un ou l'autre de ces stress : rv2009-0550c et rv1955-1956 en réponse au stress hypoxique et rv1560-1561 et rv0549c-0550c en réponse au traitement à l'IFN- γ . Par conséquent, l'expression des gènes de différents systèmes TA pourrait être régulée de façon indépendante en fonction des conditions environnementales. La conclusion proposée dans cette étude est que cette expression différentielle des TA serait non pas liée à une régulation transcriptionnelle directe, mais de façon indirecte, liée à la dégradation spécifique des antitoxines suite à l'activation de protéases, levant ainsi l'auto-régulation négative réalisée par les antitoxines sur leur propre opéron TA (Ramage et al., 2009).

E. La régulation de l'expression des systèmes TA par des protéines chaperonnes : cas des systèmes TAC

Une régulation originale de l'expression de gènes TA a été mise en évidence chez *M. tuberculosis* pour le module HigB(Rv1955)-HigA(Rv1956) (Sala et al., 2013) (**Figure 37**). L'activation de l'expression de ce système TA se fait via une protéine chaperonne, SecB-like (Rv1957), codée par le même opéron que celui des gènes *higBA*. La chaperonne interagit directement avec l'antitoxine HigA, la protège de la dégradation et limite son agrégation, facilitant ainsi son interaction avec la toxine HigB (Bordes et al., 2011). Ce système tripartite Toxine-Antitoxine-Chaperonne (TAC) est significativement induit en réponse à un stress comme l'exposition à une température élevée (Stewart et al., 2002) ou un stress hypoxique (Ramage et al., 2009) ainsi que lors d'un état de dormance (Keren et al., 2011) ce qui suggère un rôle important de ce système dans l'adaptation aux stress perçus par *M. tuberculosis*. La protéine chaperonne SecB-like rv1957 est proche de la

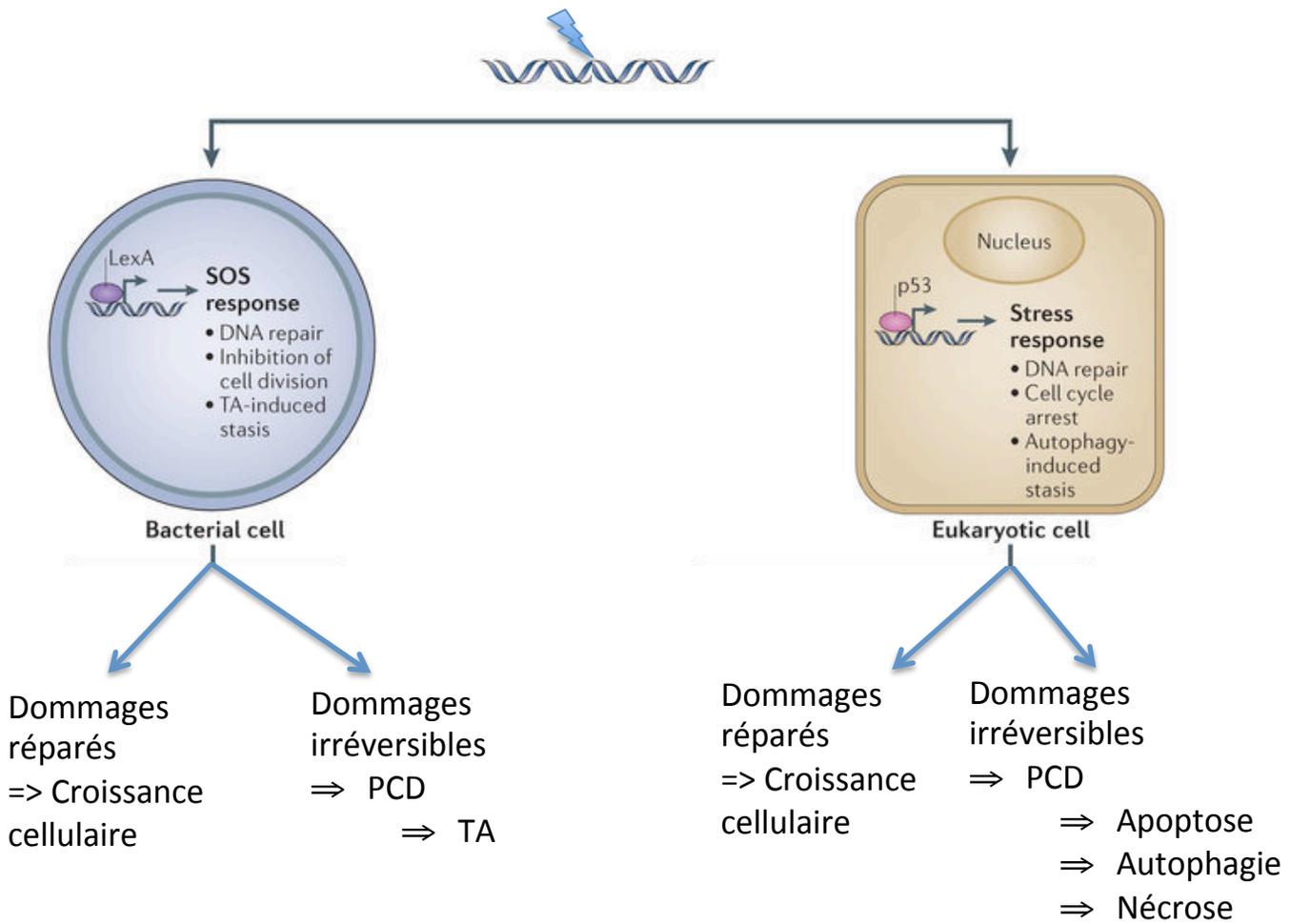


Figure 38 : La mort cellulaire programmée chez les bactéries

Le stress cellulaire, tel que celui induit par des agents endommageant l'ADN, induit un programme de réponse au stress qui inclut des mécanismes de réparation de l'ADN et les voies de la mort cellulaire chez les bactéries comme chez les eucaryotes. Cette réponse comprend des mécanismes pour inhiber la division cellulaire. Si les dommages sont minimes, les mécanismes de réparation seront suffisants pour rétablir la cellule en ordre de marche. Chez les bactéries, le régulateur LexA de la réponse SOS a un rôle dans la coordination de la réponse aux dommages de l'ADN, cela inclut les processus qui se traduisent par le recyclage des composants cytoplasmiques. Si les dommages sont irréparables, la mort cellulaire programmée (PCD) s'ensuit. La mort cellulaire est induite par les systèmes TA chez les bactéries et par l'induction de protéines mitochondriales ou autophagique chez les eucaryotes .

protéine SecB d'*E. coli*. Chez *E. coli*, SecB est une chaperonne homotetramérique de 69KDa qui se fixe à certaines protéines à exporter et les adresse spécifiquement à SecA, composant moteur du translocon de sécrétion Sec présent sur la membrane plasmique (Bordes et al., 2011; Sala et al., 2013).

En conclusion de cette partie consacrée à la régulation de l'expression des systèmes TA, il ressort que le ratio T/A est important pour l'autorégulation négative des opérons TA, que les protéases jouent un rôle majeur dans l'équilibre A-T en dégradant l'antitoxine et qu'il existe même des systèmes de protection spécifique d'antitoxine.

VI. Les rôles biologiques des systèmes TA de type II

La découverte de systèmes TA chromosomiques, ubiquistes dans le règne procaryote et en nombre souvent multiple au sein d'un même génome, a soulevé la question de leur(s) rôle(s) biologique(s). Le nombre et la diversité des systèmes TA de type II découverts n'a cessé d'augmenter depuis une dizaine d'année tout comme les rôles biologiques qui leur sont associés.

Un des premiers rôles proposé est l'implication de systèmes TA dans la réponse aux stress en permettant soit un suicide altruiste de type mort cellulaire programmée (PCD) d'une partie de la population, soit un état de dormance en induisant un changement global et rapide du métabolisme cellulaire. Ces hypothèses sont majoritairement issues de l'étude de deux systèmes TA de type II modèles, MazEF et RelBE de la souche K12 d'*Escherichia coli* (Moyed and Bertrand, 1983; Engelberg-Kulka et al., 2006; Kolodkin-Gal and Engelberg-Kulka, 2006; Amitai et al., 2009; Leplae et al., 2011).

Plus récemment, des études portant sur les systèmes TA de bactéries pathogènes humaines ont montré un rôle des systèmes TA de type II de la famille VapBC dans le maintien et la survie de la bactérie dans la cellule hôte (Frampton et al., 2011; Georgiades and Raoult, 2011; Ren et al., 2012; De La Cruz et al., 2013).

A. Le suicide altruiste ou Mort cellulaire programmée (PCD=Programmed cell death)

Le plus grand obstacle à la reconnaissance de l'existence d'une mort cellulaire programmée bactérienne est la nature unicellulaire des bactéries. En effet, le suicide cellulaire semble,

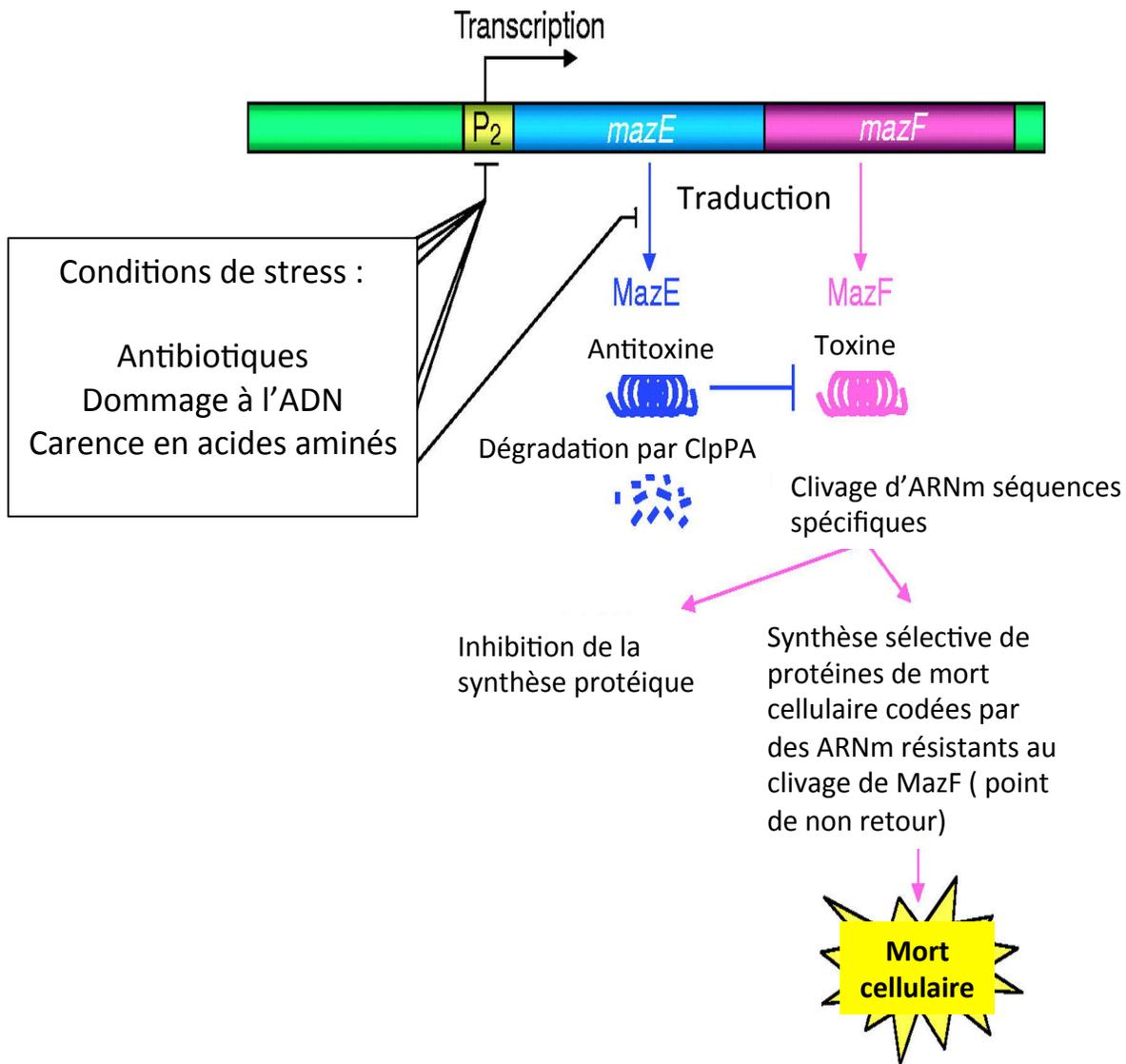


Figure 39 : La mort cellulaire programmée (PCD) par le système MazEF

Représentation schématique de la PCD dépendante du module MazEF chez *E. coli*

Tiré de : Engelberg-Kulka H. *et al.* 2005

dans ces conditions, contre intuitif et contraire aux processus d'évolution et forces gouvernant la sélection naturelle. En effet, quel peut être le bénéfice pour l'organisme unicellulaire à maintenir des gènes dont la fonction est de contrôler sa propre mort ? Si on considère les bactéries non plus individuellement mais comme une population, le sacrifice d'un individu ou d'une sous-population d'individus pourrait se justifier par un bénéfice pour la population.

Le terme « mort cellulaire programmée » ou PCD est associé à tous les processus liés au suicide cellulaire. Chez les eucaryotes, le phénomène d'apoptose est le mécanisme le mieux connu et le plus couramment associé à la PCD (Bayles, 2014). Pour autant, d'autres mécanismes de mort cellulaire tels que l'autophagie ou la nécrose sont également retrouvés. Tous ces mécanismes requièrent de l'énergie et sont typiquement induits en réponse à un signal physiologique ou développemental. Chez les bactéries, un processus de type « mort cellulaire programmée » a été montré chez *E. coli* par l'induction d'un système TA (**Figure 38**).

Cette mort cellulaire programmée orchestrée par les systèmes TA a particulièrement été étudiée chez *E. coli* grâce notamment à l'étude approfondie du système MazEF. Le gène *mazF* code la toxine stable et *mazE* l'antitoxine qui est dégradée par la protéase sérine ATP-dépendante ClpPA. MazE et MazF interagissent et forment un complexe protéique. Les deux gènes sont co-exprimés et le complexe protéique autorégule négativement l'expression de l'opéron. Ce système est activé par différentes conditions comme par exemple la carence en acides aminés, la présence d'antibiotiques ou encore les dommages à l'ADN. Par conséquent ce module MazEF d'*E. coli* a été décrit comme un module suicide, activé en condition de stress. L'activation de ce module suicide entraîne la mort d'une partie de la population bactérienne et permet à une sous-population de résister aux conditions de stress en attendant le retour à des conditions optimales de croissance (Engelberg-Kulka et al., 2006). Toutefois, aujourd'hui encore, la notion même de « mort cellulaire » contrôlée par les systèmes TA est discutée. En effet, certains auteurs attribuent à ces systèmes un rôle plus bactériostatique que bactéricide, l'effet toxique obtenu par surexpression de la toxine MazF pouvant être annulé par l'action de l'antitoxine MazE surproduite de façon ectopique (Pedersen et al., 2002). Certaines études proposent que l'effet bactéricide soit dû à un stress prolongé, de telle sorte que l'activité RNase de la toxine MazF sur la synthèse de protéines essentielles à la survie bactérienne entraîne la bactérie vers la mort cellulaire. L'effet antidote de l'antitoxine ne serait donc possible que pendant un certain laps de temps. Un point de non-retour serait alors défini par un stress et une expression de toxine MazF trop prolongée qui ferait basculer l'équilibre T/A vers un effet bactéricide (Pedersen et al., 2002; Engelberg-Kulka et al., 2006) (**Figure 39**).

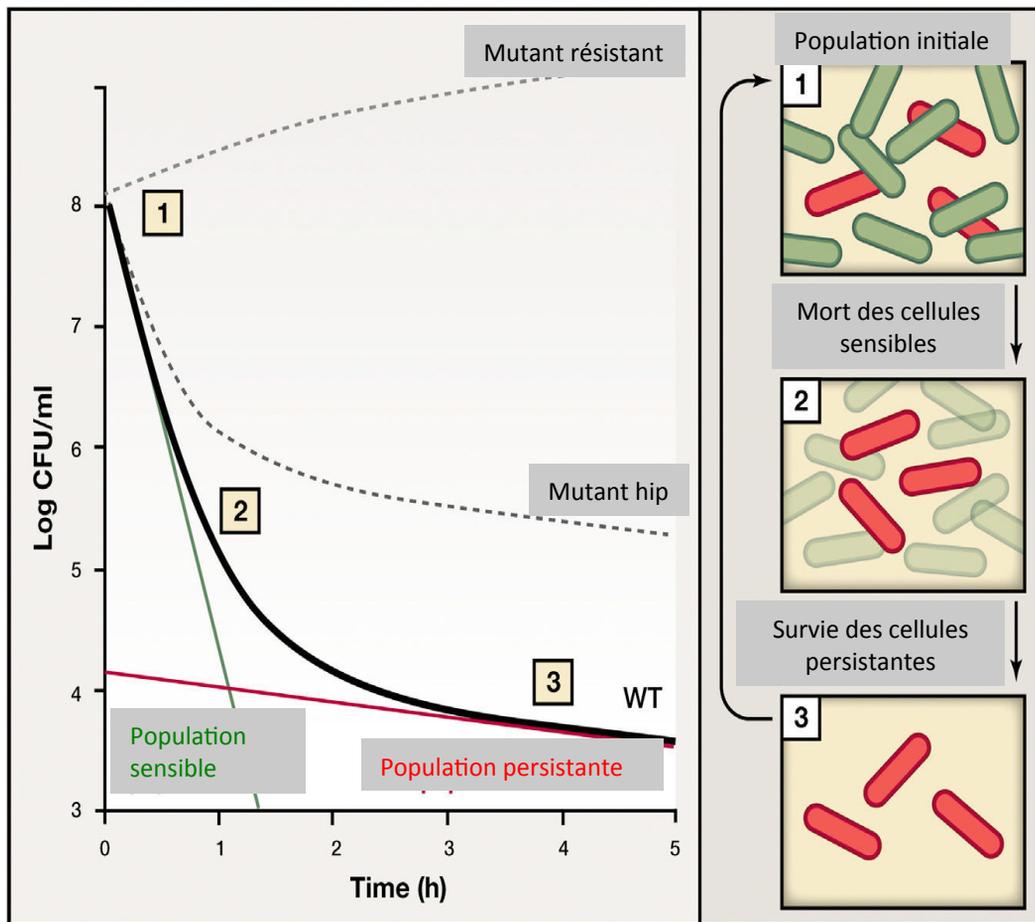


Figure 40 : La persistance bactérienne

(1) Une dose létale d'antibiotique est ajoutée au temps zéro à une population bactérienne génétiquement homogène, sensible et en phase de croissance. L'expérience de survie révèle une courbe biphasique. La chute de la première phase révèle la sensibilité d'une grande partie de la population (2). Sur cette partie, une droite pouvant être tracée, elle révèle une cinétique de mort exponentielle des bactéries (droite verte). (3) La pente plus faible de la seconde phase révèle l'existence d'une sous-population de bactéries persistantes ou tuées avec une cinétique plus lente. En comparaison, un mutant invalidé pour *hipA* (toxine) de l'opéron *hipAB*, présente une courbe avec une pente beaucoup plus faible et donc un niveau plus élevé de bactéries persistantes. Après élimination de l'antibiotique (schéma à droite), les cellules persistantes reprennent un mécanisme de division cellulaire et vont ainsi donner des cellules identiques aux cellules initiales avec la même sensibilité.

B. La régulation globale du métabolisme cellulaire et la persistance bactérienne

1. La régulation du métabolisme cellulaire

Les bactéries peuvent être exposées à des changements environnementaux tels qu'une variation de température, d'osmolarité, de pH ou de disponibilité en nutriments. Elles doivent donc s'adapter à ces changements en ajustant leur métabolisme rapidement. Les mécanismes de survie (inhibition de la réplication, de la synthèse d'ARNr ou ARNt, de la division cellulaire, activation de facteur sigma, de gènes de réponse aux stress) sont mis en place par la bactérie pour s'adapter à ces conditions de croissance moins favorables. L'adaptation de la bactérie à une carence en acides aminés, appelée réponse stringente, a été particulièrement bien étudiée. Elle est définie par les changements physiologiques qui sont induits chez la bactérie suite à cette carence.

L'implication des systèmes TA de la famille RelBE d'*E. coli* dans la réponse stringente a été proposée (Christensen and Gerdes, 2004). En effet, en réduisant le pool d'ARNm durant la période de carence, cette toxine agirait comme un régulateur global du métabolisme. Par ailleurs, il a été montré que la transcription du locus *relBE* augmente fortement suite à une carence en acides aminés. La transcription de *relBE* dépend de la protéase Lon, activée au cours d'une carence nutritionnelle. En effet, l'antitoxine RelB qui régule l'expression de l'opéron est dégradée par Lon (Christensen and Gerdes, 2004). Enfin, chez *Mycobacterium smegmatis*, l'analyse de l'expression de gènes par microarray montre que la surexpression de VapC/VapBC entraîne une augmentation du pourcentage de gènes dérégulés. Parmi ces derniers, des gènes impliqués dans le transport de carbone et le métabolisme, suggèrent que la toxine VapC cible des ARNm spécifiques du métabolisme.

2. La persistance cellulaire : cas des bactéries pathogènes

Les bactéries pathogènes telles que *Mycobacterium tuberculosis*, *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* ou *Salmonella enterica* sont capables de développer des populations persistantes, à l'origine d'infection chronique. Aussi, tout comme l'acquisition

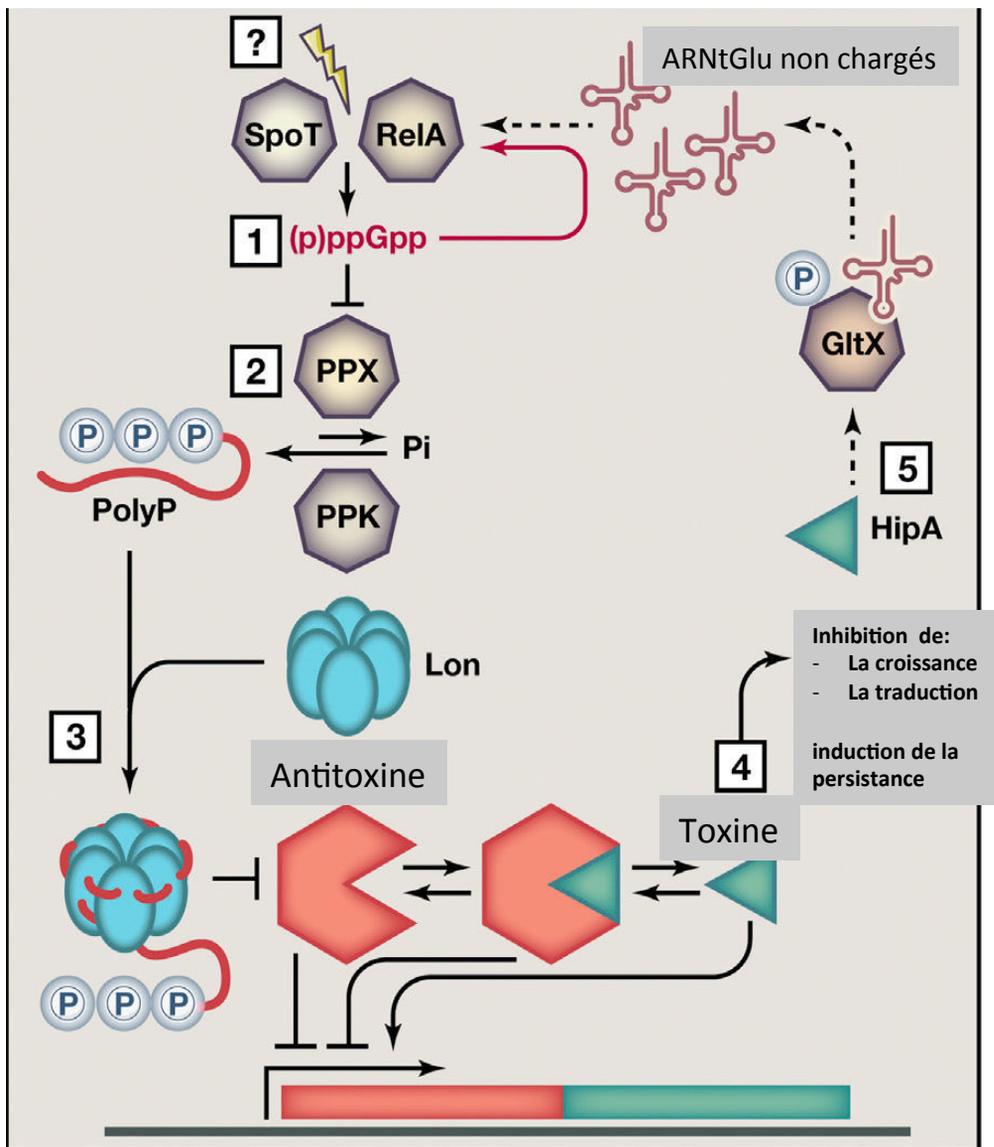


Figure 41 : Rôle de la toxine HipA dans la persistance

(1) L'activation de RelA ou SpoT dans les cellules induit l'accumulation de ppGpp. L'inhibition ppGpp-dépendante de l'exopolyphosphatase (PPX) (2), entraîne une accumulation de polyP qui active la protéase Lon (3) et entraîne la dégradation des antitoxines des systèmes de type II présents chez *E. coli* K12. Les toxines alors libérées vont inhiber la croissance cellulaire et induire la persistance. (5) Le modèle prédit que la dégradation de HipB (antitoxine) permet à la protéine HipA (toxine) libre, de phosphoryler le Glutamyl-ARNt synthétase (GltX) et d'inhiber le chargement de l'ARNt. L'ARNtGlu non chargé déclenche la synthèse de ppGpp dépendante de RelA.

de résistances (mutation spontanée, gènes de résistance), l'apparition de populations persistantes, capables d'échapper à l'action d'un antibiotique via l'entrée dans un état physiologique de « dormance » où les antibiotiques ne sont plus efficaces, explique également l'échec des traitements antibiotiques.

Ce phénomène de persistance, découvert par Bigger en 1944 chez *Staphylococcus aureus*, est provoqué par la présence d'une sous-population de cellules bactériennes présentant une croissance ralentie au milieu d'une population où la croissance est exponentielle. Cette sous-population, est alors tolérante aux antibiotiques et autres agressions environnementales alors que le reste de la population y est sensible (Maisonneuve and Gerdes, 2014) (**Figure 40**). Les antibiotiques étant particulièrement efficaces sur des cellules en division active, cela suggère que la persistance est liée à la capacité des bactéries à rentrer dans un stade de faible activité métabolique similaire à un état de dormance. Il s'agit du même état de dormance que l'on retrouve également lors de la réponse stringente.

Le rôle de systèmes TA dans la mise en place de la persistance cellulaire a récemment été proposé. En effet, la toxine HipA du système HipAB d'*E. coli* est une sérine/thréonine kinase capable de phosphoryler la protéine GltX (protéine catalysant l'attachement du glutamate sur l'ARNt), la rendant ainsi inactive (**Figure 41**). Cette inactivation conduit à une accumulation d'ARNt non chargés responsable de l'induction de la réponse stringente grâce à la synthèse d'une alarmone, la Guanosine tétraphosphate (ppGpp) par RelA. Le ppGpp est une petite molécule qui régule l'expression de nombreux gènes bactériens. L'accumulation de ppGpp inhibe l'exopolyphosphatase (PPX), enzyme responsable de la dégradation du polyphosphate (polyP), permettant ainsi son accumulation. Le PolyP, polymère linéaire de plusieurs centaines de résidus phosphate, est capable de se lier à la protéase Lon pour l'activer. Son accumulation aboutit donc à la dégradation des antitoxines des systèmes TA de type II présents chez *E. coli* K12 dont HipB. Ceci permet une inhibition globale de la traduction, un arrêt de croissance et une tolérance des cellules à l'action létale des antibiotiques, à l'origine du phénomène de persistance (Germain et al., 2013; Kaspy et al., 2013; Maisonneuve et al., 2013). Ce modèle a été conforté par la démonstration qu'une souche déficiente en protéase Lon, en polyP (*ppk*) ou en ppGpp (*relA/SpoT*) présente une diminution importante du taux de cellules persistantes tandis qu'à l'inverse, la surproduction de la protéase ou du polyP (*ppk+* *ppx-*) entraîne une augmentation du nombre de cellules persistantes. (Germain et al., 2013; Maisonneuve et al., 2013). Plus récemment, il a été mis en évidence que les espèces bactériennes disposant d'une population enrichie de cellules persistantes présentent un nombre important de systèmes TA (Pedersen et al., 2002; Shah et al., 2006).

Le modèle proposé pour la mise en place de la persistance bactérienne repose donc sur une cascade de régulation où une augmentation du ppGpp favorise la dégradation des antitoxines grâce à l'activation, par le polyP, de la protéase Lon. Or, la concentration du ppGpp varie inversement à la croissance bactérienne avec un pic en phase stationnaire. Aussi, la persistance semble être corrélée au taux de ppGpp et donc inversement corrélée au taux de croissance des bactéries (Gerdes and Maisonneuve, 2012).

L'ensemble de ces études *in vitro* sur le rôle des systèmes TA dans la régulation de la persistance bactérienne a récemment été conforté grâce à l'étude *in vivo* de la persistance de *Salmonella enterica serovar Typhimurium* dans le macrophage (Helaine and Kugelberg, 2014). Grâce à une méthode dynamique permettant de quantifier *in vivo* la division des bactéries dans le macrophage, il a été démontré qu'une proportion importante des salmonelles se retrouve dans un état de dormance avant d'entrer dans le macrophage (Helaine et al., 2010). Grâce à une analyse en cytométrie de flux, les auteurs ont d'autre part pu montrer que la majorité des cellules présentes dans les organes infectés ne présentent pas de réplication. Ainsi, pour persister dans le macrophage, ces bactéries sont capables de réaliser un changement rapide de leur métabolisme avec un arrêt de la division et de la réplication. L'analyse du génome de *Salmonella* révèle la présence de 14 systèmes TA de type II putatifs. Pour chacun de ces loci, des mutants de délétion ont été analysés. Chez ces mutants, une réduction de 10 à 30% du nombre de bactéries non répliquatives est observée dans les macrophages infectés par rapport à la souche sauvage, suggérant un rôle de ces systèmes TA dans l'établissement de la persistance.

C. Les gènes TA : des gènes égoïstes ?

Bien qu'il soit connu depuis longtemps que les bactéries puissent échanger des informations génétiques par des transferts horizontaux, l'impact de ce processus dynamique sur l'évolution des génomes n'a été étudié que depuis une dizaine d'années, par comparaison génomique. Les chromosomes bactériens sont composés de gènes ayant différentes origines. Un groupe de gènes préférentiellement transmis par transfert vertical au cours d'un long processus d'évolution compose le cœur du génome. Ces gènes sont ainsi relativement conservés dans différents groupes monophylétiques et codent des fonctions cellulaires conservées. Ces gènes sont « mélangés » avec des gènes qui sont eux acquis par transmission horizontale d'autres procaryotes. La plupart sont issus d'intégration d'éléments génétiques mobiles. Ils sont souvent retrouvés chez des espèces

phylogénétiquement éloignées et ne sont souvent pas conservés entre différents isolats d'une même espèce. Ces gènes constituent une partie flexible du génome.

Les systèmes TA font partie de ce second type de gènes. Ils sont présents à la fois sur les chromosomes et sur les plasmides de nombreuses espèces. En effet, l'étude de plusieurs isolats d'*E. coli* a montré que ceux-ci ne présentent pas le même nombre de systèmes TA. Ceci implique que l'apparition des systèmes TA au niveau des chromosomes doit être récente. Une hypothèse quant au rôle de ces systèmes, est qu'ils agiraient comme des « gènes égoïstes » (Van Melderen and Saavedra, 2009 ; Van Melderen, 2010). Cette notion d'égoïsme des gènes a été proposée en 1976 par Richard Dawkins dans son livre « The Selfish Gene », où il propose que le gène agit comme élément central de la sélection naturelle et non plus l'organisme lui-même qui ne serait que le porteur du gène. Les gènes TA et leurs produits, la toxine et l'antitoxine sont finement liés (l'antitoxine inhibant l'action toxique de la toxine) et sont capables de passer d'un génome à l'autre par transfert horizontal de gènes, ainsi que de se maintenir dans une population bactérienne, au moins pour ceux présents sur les plasmides. Ainsi les systèmes TA plasmidiques induisent un effet addictif (Post segregational Killing PSK) qui leur assurent une propagation dans la population et pourrait en partie expliquer leur maintien au cours de l'évolution. Pour les TA chromosomiques, certains se sont donc intégrés dans le génome bactérien et confèrent un avantage à leur hôte. Le système MazEF, par exemple, est décrit chez *E. coli* comme permettant la survie d'une sous-population en cas de carence nutritionnelle en contrepartie de la mort (PCD) de la majorité de la population bactérienne. Ces systèmes qui contribuent au maintien des plasmides permettraient de stabiliser des îlots génomiques chromosomiques proches (Makarova et al., 2011). Ils représentent un conflit génétique et par la même une force motrice de l'évolution (Mruk and Kobayashi, 2014). En effet, ils sont addictifs et assurent ainsi le maintien de certaines régions importantes du génome. Cependant, bien que conservés dans les génomes bactériens, ils peuvent aussi être responsables de la mort bactérienne programmée.

En conclusion, il n'y a pas de doute sur le succès évolutif des systèmes TA. Certains génomes bactériens en possèdent jusqu'à plus de 80. Certaines espèces bactériennes ayant subi une réduction de leur génome, du fait de leur mode de vie, possèdent encore certains systèmes TA. Leur distribution implique que ce sont des éléments très mobiles. Leur caractère « égoïste » pourrait être une hypothèse pour expliquer qu'ils se stabilisent et soient réfractaires au flux de gènes. Il semblerait que les systèmes TA de type II proviennent de différents ancêtres qui se seraient assemblés de multiples fois au cours de l'évolution. Une meilleure connaissance de leurs rôles biologiques pourrait permettre de découvrir de nouveaux facteurs influençant leur évolution.

D. Le maintien et la survie dans la cellule hôte : exemple de la famille VapBC

Les systèmes TA ne sont pas seulement impliqués dans les processus physiologiques généraux de la bactérie comme la réponse aux stress et la persistance, mais ils ont également un impact direct sur la pathogénicité des bactéries.

Il a été récemment observé qu'un nombre plus important de systèmes TA de type II, en particulier de la famille VapBC, était présent chez les bactéries pathogènes (*Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Rickettsia prowazekii*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Treponema pallidum*, *Yersinia pestis*, *Bordetella pertussis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae* et *Vibrio cholerae*...) par rapport à leurs homologues non pathogènes (*Mycobacterium avium*, *Mycobacterium smegmatis*, *Rickettsia africae*, *Treponema denticola*, *Bordetella bronchiseptica*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus suis*, *Salmonella schwarzengrund*, *Vibrio parahaemolyticus*...) (Georgiades and Raoult, 2011).

La sur-représentation des systèmes TA dans les génomes de bactéries pathogènes a soulevé la question d'un rôle possible des TA dans la virulence bactérienne, pour permettre de résister aux conditions de stress rencontrés par le pathogène pendant l'étape de colonisation, ou en permettant un état de dormance sur le long terme pour les pathogènes survivant dans des macrophages, ou la survie dans des organes infectés (De La Cruz et al., 2013).

1. Les systèmes VapBC : facteurs de virulence ?

Le rôle des systèmes VapBC (pour Virulence-Associated Protein) dans la pathogénicité a été envisagé pour la première fois chez la bactérie pathogène de l'homme, *Neisseria gonorrhoeae* (Mattison et al., 2006). *N. gonorrhoeae* est un pathogène sexuellement transmissible qui entraîne une infection après adhésion aux muqueuses génitales. La bactérie invasive entre au niveau de la région apicale de la cellule, la traverse et ressort au niveau de la matrice subcellulaire. Des mutations dans un locus appelé *fitAB* (pour « Fast Intracellular Trafficking ») induisent un trafic accéléré des bactéries mutantes au travers d'une monocouche de cellules polarisées, ainsi qu'une répllication plus rapide en culture pure par rapport aux bactéries sauvages. L'opéron *fitAB* code en fait un système TA de type II de la famille VapBC dont la toxine FitB (= VapC) semble jouer un rôle dans la virulence puisque sa

mutation entraîne une modification du trafic bactérien au travers de l'épithélium, rendant ainsi la bactérie mutante plus sujette à la réponse immunitaire de l'hôte puisque plus visible par celui-ci en traversant plus rapidement la monocouche cellulaire.

Chez la bactérie pathogène humaine *Haemophilus influenzae*, responsable d'infection respiratoire, la délétion de *vapBC1*, *vapXD* induit une réduction de la survie des bactéries en co-culture avec des cellules primaires humaines de tissus respiratoires. Ces mutants ne sont pas affectés en culture pure dans un milieu riche. Ces systèmes TA de type II de la famille VapBC ont donc été montrés comme impliqués dans la survie bactérienne et la virulence *in vitro* et *in vivo* (modèle chinchilla) et possèdent une activité RNase avérée des toxines VapC1 et VapD (Ren et al., 2012).

De façon encore plus surprenante, le rôle dans la pathogénicité d'un système VapBC a récemment été proposé chez *Pseudomonas aeruginosa* (Hood et al., 2010). Il a été montré chez cette bactérie qu'un système de sécrétion de Type VI (TSS6) ciblait une toxine de la famille VapC (appelée Tse2) aux bactéries. La protéine TSE2 a été montrée comme arrêtant la croissance des cellules procaryotes et eucaryotes, quand elle exprimée de manière intracellulaire. En revanche, TSE2 sécrétée n'a aucun effet sur les cellules eucaryotes; mais elle fournit un avantage majeur pour la croissance de souches de *P. aeruginosa*, d'une manière dépendante du contact des cellules et via le T6SS H1.

Enfin, le rôle des toxines VapC sur la viabilité de la cellule hôte a récemment été démontré *in vivo* chez la bactérie pathogène intracellulaire stricte *Rickettsia spp.* (Audoly et al., 2011). L'exposition au chloramphénicol de cellules humaines infectées par *Rickettsia* se traduit par une apoptose précoce des cellules eucaryotes couplée à une surexpression et surproduction de toxines VapC libérées dans la cellule hôte. Les auteurs ont alors proposé que les systèmes TA, chez cette bactérie pathogène, pouvaient agir comme facteurs de virulence sur la cellule hôte.

2. Les systèmes VapBC : rôle chez les bactéries symbiotiques

Sinorhizobium meliloti est une rhizobiaceae capable d'établir une symbiose fixatrice d'azote avec des plantes de la famille des légumineuses. La caractérisation d'un mutant susceptible de maintenir une symbiose efficace en présence d'azote minéral dans le milieu, a permis de mettre en évidence le rôle d'un système TA de la famille VapBC (NtrPR) dans le métabolisme symbiotique de *S. meliloti* (Olah et al., 2001 ; Bodogai et al., 2006). Un mutant *ntrR* (*vapC*) présente, en symbiose avec la luzerne, une augmentation de la capacité fixatrice d'azote et une amélioration du rendement végétal, suggérant que ce système TA contribue à ajuster le métabolisme de la bactérie en condition symbiotique. Cette

hypothèse a été validée dans une étude de transcriptomique comparant, en condition anaérobie et aérobie, la souche sauvage et le mutant d'inactivation de NtrR. Ceci a permis de mettre en évidence que NtrR module la transcription de nombreux gènes dans ces deux conditions (Puskas et al., 2004).

Enfin des travaux réalisés sur une autre bactérie symbiotique fixatrice d'azote *Bradyrhizobium japonicum*, interagissant avec le soja, ont permis de montrer la présence d'un système TA-like (Bat/Bto). Un mutant de ce système présente une modification de la croissance en culture pure dans un milieu riche. L'absence de ce module entraîne une altération de la composition en lipides membranaires et donc une altération de la membrane. La toxine Bto présente un domaine PIN similaire à NtrR et par conséquent, le phénotype symbiotique de ce mutant a été testé en interaction avec le soja. Soixante jours après inoculation, la comparaison des plantes inoculées avec les souches WT ou mutantes montre une réduction de 60% dans l'efficacité de nodulation des mutants par rapport au WT. De plus, une altération du rendement végétal a été mesurée avec une perte de 40% du poids des parties aériennes (Miclea et al., 2010).

Enfin, récemment, des travaux ont été réalisés sur les systèmes TA prédits sur les mégaplasmides de *S. meliloti*. Sur approximativement 100 systèmes TA putatifs, présents sur les plasmides pSymA and pSymB, quatre systèmes TA ((relB/E [sma0471/sma0473], Fic [DOC] [sma2105], et VapC [PIN][orf2230/sma2231]), dont la perte est associée à une mort cellulaire ou à un effet bactériostatique en culture pure, ont été identifiés. L'un d'entre eux est un système VapBC. Toutefois, ces quatre systèmes n'ont pas de rôle direct dans la symbiose entre *S. meliloti* et la luzerne (Milunovic et al., 2014).

Par conséquent, avant les travaux de thèse présentés ci-après, les travaux sur NtrRP de *S. meliloti* et le système TA-like de *B. japonicum*, étaient les seuls décrivant les effets d'un mutant de TA sur une bactérie symbiotique, qu'elle soit végétale ou animale

OBJECTIFS DE THESE :

Les données rassemblées dans l'introduction bibliographique montrent que la symbiose fixatrice d'azote entre *S. meliloti* et *Medicago sp.* a une durée naturellement limitée, qui se manifeste par l'entrée en sénescence de l'organe symbiotique, la nodosité. Pour les légumineuses qui présentent un intérêt agronomique, un des enjeux de la symbiose fixatrice d'azote consiste à retarder ce processus de sénescence, afin d'augmenter le rendement végétal. Cette rupture symbiotique, caractérisée par la mise en place du processus de sénescence nodositaire, commence par la sénescence des bactéroïdes suivie de celle des cellules végétales. Afin de mieux comprendre le rôle du partenaire bactérien dans l'entrée en sénescence, nous nous sommes intéressés au rôle possible des systèmes Toxine-Antitoxine (TA) dans l'interaction symbiotique. Ces systèmes sont en effet décrits comme jouant un rôle dans la mortalité bactérienne ou au contraire dans la survie intracellulaire chez certaines espèces bactériennes non symbiotiques.

Des études récentes réalisées sur des espèces bactériennes pathogènes, ont montré que certains systèmes TA appartenant à la famille VapBC pouvaient jouer un rôle majeur dans la survie de la bactérie. En effet, en jouant le rôle de « régulateur global », ces systèmes VapBC pourraient permettre une adaptation rapide de la bactérie à un changement d'environnement, situation rencontrée par *S. meliloti* lors de son passage de l'état libre dans la rhizosphère à celui de bactéroïde différencié fixateur d'azote dans la nodosité.

Dans ce travail de thèse, nous avons donc cherché à comprendre le rôle que pourraient jouer les systèmes VapBC de *S. meliloti* sur la rupture symbiotique et par conséquent, sur le rendement végétal, en suivant trois stratégies.

Stratégie 1 (Partie 1 des Résultats):

Dans un premier temps, nous avons étudié de façon globale le rôle symbiotique des 11 systèmes VapBC putatifs codés par le chromosome de *S. meliloti*. Sachant que 4 mutants d'inactivation du gène de la toxine *vapC* étaient présents dans les banques de mutants (3 d'entre eux) ou déjà caractérisé (1, NtrPR (Bodogai et al., 2006)), nous avons construit des mutants d'inactivation du gène *vapC* dans les 7 systèmes VapBC pour lesquels des mutants

n'étaient pas disponibles. L'étude du phénotype de ces mutants en interaction avec la légumineuse modèle *M. truncatula* a alors été réalisée. Ce travail a été complété par des analyses bioinformatiques afin de (i) déterminer l'homologie des séquences protéiques entre les différentes antitoxines VapB et toxines VapC de *S. meliloti*, (ii) analyser l'expression des opérons *vapBC* en culture pure et dans la nodosité fonctionnelle, grâce à des données de transcriptomiques récentes. La démonstration de la fonctionnalité de ces systèmes a également été étudiée en développant des tests de toxicité des toxines VapC chez *E. coli*. Une fois la validation des effets toxiques de toutes les toxines VapC achevée, ce travail pourra faire l'objet d'une publication présentant une analyse globale du rôle symbiotique des systèmes VapBC chromosomiques de *S. meliloti*.

Dans le cadre du travail de thèse, en plus de cette étude globale, la caractérisation fine de deux modules VapBC particuliers a été réalisée.

Stratégie 2 (Partie 2 des Résultats):

Des recherches d'homologie ont permis de montrer que le module VapBC5 était celui présentant la plus forte homologie de séquences protéiques avec le module NtrPR décrit dans la littérature (Bodogai et al., 2006), pour lequel un mutant dans le gène de la toxine *ntrR* conduit à un phénotype symbiotique amélioré. En collaboration avec l'équipe hongroise d'Ilona Dusha, la caractérisation du module VapBC5 a donc été réalisée. Pour cela, après avoir démontré que les protéines VapB5 et VapC5 agissaient, respectivement, en tant qu'antitoxine et toxine fonctionnelles, des mutants d'inactivation des gènes *vapB5* ou *vapC5* et de délétion de tout l'opéron ($\Delta vapC5$) ont été analysés pour leur phénotype symbiotique avec *Medicago sativa* (luzerne). Un des résultats majeurs de ce travail est la démonstration du rôle de ce module dans la sénescence nodositaire et le rendement végétal. Ces travaux ont fait l'objet d'une publication dans Environmental Microbiology en 2014.

Stratégie 3 (Partie 3 des Résultats):

L'analyse de l'expression des systèmes TA de la famille VapBC dans la nodosité a montré que le gène codant pour la toxine VapC7 présentait un profil d'expression nodositaire atypique par rapport à celui des autres gènes *vapC*. A savoir, une forte expression dans la zone III de fixation et également dans la partie basale de la nodosité enrichie en zone IV. Une étude approfondie de ce module VapBC7, proche en terme d'homologie des modules

VapBC5 et NtrPR, a donc été réalisée. Pour cela, le phénotype symbiotique d'un mutant d'inactivation du gène de la toxine VapC7 a été étudié lors de l'interaction avec la plante modèle *Medicago truncatula*. Il présente un défaut dans sa capacité fixatrice d'azote associé à une sénescence nodositaire précoce. L'étape du processus symbiotique affectée chez *M. truncatula* en interaction avec ce mutant a été recherchée. Nos travaux ont montré que le module VapBC7 était impliqué dans l'efficacité de différenciation des bactéries en bactéroïdes et jouait un rôle majeur dans la survie du bactéroïde dans la cellule végétale infectée. Enfin, une étude biochimique de la toxine VapC7 purifiée a été réalisée et a permis, de démontrer son activité RNase *in vitro*. Ces travaux font l'objet d'une publication en cours de rédaction.

RESULTATS PARTIE 1 :

ANALYSE GLOBALE DES SYSTEMES TOXINE ANTITOXINE DE
TYPE II DE LA FAMILLE VAPBC CHEZ *S. MELILOTI*

Afin de comprendre le rôle potentiel des systèmes TA dans la rupture symbiotique et la survie de la bactérie au sein de la cellule hôte végétale, nous avons développé une étude globale des systèmes Toxine Antitoxine de type II de la famille VapBC, codés par le chromosome, chez la bactérie symbiotique *Sinorhizobium meliloti*.

Au regard des données de la littérature, les systèmes TA de la famille VapBC semblent être de bons candidats pouvant jouer un rôle dans la survie intracellulaire, notamment chez la bactérie pathogène de l'homme *Mycobacterium tuberculosis* (Ramage et al., 2009). De plus, les systèmes VapBC participent à la mise en place du processus de persistance en réponse à un traitement antibiotique ou tout autre stress abiotique provoquant un ralentissement de la croissance bactérienne et un changement rapide du métabolisme bactérien (Ramage et al., 2009; Gerdes and Maisonneuve, 2012; McKenzie et al., 2012; Ren et al., 2012; Helaine and Kugelberg, 2014). Enfin, le rôle d'un de ces systèmes VapBC sur l'efficacité symbiotique a déjà été démontré chez *S. meliloti*. En effet, l'inactivation du gène de la toxine *ntrR* du système NtrRP (ou VapBC4) se traduit par une augmentation du rendement végétal consécutif à une meilleure capacité fixatrice d'azote de la plante hôte *Medicago sativa* (Olah et al., 2001; Bodogai et al., 2006). L'analyse par microarray, du transcriptome du mutant d'inactivation de la toxine *ntrR*, réalisée en condition d'aérobic ou de microoxie, révèle une expression différentielle de 7% des 6207 gènes examinés chez le mutant par rapport au sauvage (4,5% en condition aérobic et 2,5% en condition microoxie). Chez le mutant *ntrR*, un niveau d'expression des gènes symbiotiques *nif/fix* supérieur à celui d'une souche sauvage a ainsi pu être observé (Puskas et al., 2004).

Afin de réaliser une analyse globale du rôle possible des systèmes VapBC de *S. meliloti* au cours de l'interaction symbiotique, nous avons, dans un premier temps, identifié l'ensemble des systèmes VapBC chromosomiques de *S. meliloti* puis analysé *in silico* leur expression à différents stades de la culture bactérienne ou de la symbiose. Enfin, l'analyse du phénotype,

Famille	TA chromosome
VapBC	Smc02657-Smc02658
	Smc01932-Smc01933
	Smc01176-Smc01177
	Smc03949-Smc01521
	Smc00686-Smc00687
	Smc03136-Smc03137
	Smc04881-Smc04408
	Smc00392-Smc00393
	Smc00899-Smc00900
	Smc02987-Smc02988
RelBE	Smc00694-Smc00693
HicBA	Smc04441-Smc04269
	Smc02476-Smc02477
HigBA	Smc02476-Smc02477
	Smc02461-Smc02394
GNAT like-domain- /Xre like-domain	Smc00352-Smc00351
COG2929 like-Domain/RHH like-domain	Smc04431-Smc04432
reLE like-domain/Xrel like-domain	Smc00822-Smc00823
	Smc01995-Smc01836
GNAT like-domaine/Ars like-domain	Smc04221-Smc04220
COG3832 like-domain/ArsR like-domain	Smc04161-Smc04162
	Smc03843-Smc03842
GNAT like-domain/RHH like-domain	Smc00739-Smc00740
ReLE like-domain/RHH like-domain	Smc04313-Smc04312

Tableau 3. Systèmes Toxine Antitoxine chromosomiques de type II chez *S. meliloti*

Les différents systèmes TA sont identifiés via le site TA finder (<http://202.120.12.133/TAfinder/index.php>)

Famille	TA psymA	TA psymB
COG3832-like/ArsR-like	Sma0191-Sma0193	
PIN-like/COG2442-like	Sma0285-Sma0286	
relE-lik/RHH-like	Sma0473-Sma0471	
Null	Sma0545-Sma0548	
	Sma0592-Sma0594	
	Sma0972-Sma0969	
COG5654-likesmart00953/XRE-like	Sma1455-Sma1456	
PIN-like/RHH-like	Sma2253-Sma2255	
COG5654-like/COG5642-like	Sma2279-Sma2281	
	Sma2377-Sma2375	
relE-like/RHH-like		Smb20063-Smb20062
PIN-like/RHH-like		Smb20413-Smb20412
COG5654-like/COG3832-like		Smb21128-Smb21127
COG3832-like/ArsR-like		Smb21007-Smb21008
COG3832-like/COG3832-like		Smb20696-Smb20607
ArsR-like/relE-like		Smb20608-Smb20627
RHH-like		Smb20628

Tableau 4. Systèmes Toxine Antitoxine plasmidiques de type II chez *S. meliloti*

Les différents systèmes TA sont identifiés via le site TA finder (<http://202.120.12.133/TAfinder/index.php>)

en culture libre ou *in planta* chez *M. truncatula*, de mutants d'inactivation des 11 gènes des toxines VapC a été entreprise.

I. Les systèmes TA chromosomiques de type II de *S. meliloti*

A. Cartographie des systèmes TA de type II

Les différents opérons codant des systèmes Toxine Antitoxine putatifs présents sur le chromosome de *S. meliloti* ont été identifiés à l'aide de la base de données TADB (Shao et al., 2011). Cette base qui recense l'ensemble des données disponibles sur les systèmes TA de type II bactérien a permis d'identifier, par homologie de séquence, 24 systèmes TA de type II putatifs sur le chromosome de *S. meliloti* (**Tableau 3**) notamment 4 RelBE, 2 HigBA, 1HicBA et 11 appartenant à la famille VapBC. Comme chez *M. tuberculosis*, les systèmes VapBC représentent chez *S. meliloti* la famille TA de type II la plus représentée. Aussi, tout comme pour *M. tuberculosis*, se pose ici la question de la multiplicité de systèmes TA d'une même famille sur le chromosome. Une des hypothèses avancées est que chaque système pourrait jouer un rôle différent en agissant sur des cibles moléculaires distinctes et/ou en réponse à des signaux variés (Ramage et al., 2009).

Des systèmes TA de type II ont également pu être identifiés sur les deux mégaplasmides pSymA et pSymB de *S. meliloti* (**Tableau 4**). Selon les analyses bioinformatiques utilisées pour les rechercher dans le génome, leur nombre est très variable. Ainsi, dans la base de données TADB (Shao, 2011), seulement 2 systèmes TA putatifs, n'appartenant pas à la famille VapBC, sont présents sur ces réplicons (un sur chaque mégaplasmide). Selon l'algorithme Rasta (Sevin and Barloy-Hubler, 2007), ce chiffre s'élève à 14 modules TA (5 sur le pSymA et 9 sur le pSymB dont un VapBC putatif) et enfin, selon Makarova et al (2009), ce chiffre s'élève à 97 gènes « TA » sur les mégaplasmides (50 (8 VapC) sur le pSymA et 47 (4 VapC) sur le pSymB) et 114 sur le chromosome. Il est à noter que dans cette étude de Makarova et al (2009), sont comptabilisés également tous les gènes de type TA même isolés et non organisés en paire TA complète (ou un gène isolé de toxine ou celui d'une antitoxine). Ainsi, en tenant compte des systèmes incomplets, non organisés en modules, 211 gènes « TA » putatifs sont référencés dans le génome au lieu des 26 modules TA complets décrits dans la base TADB ou les 42 étendus à ceux découverts par RASTA.

Opéron	Code gènes (A – T)	Gène en amont de l'opéron TA	Gène en aval de l'opéron TA	ARNnc en antisens dans le gène de la toxine
<i>vapBC1</i>	Smc02657-Smc02658	<i>relA</i> Synthèse ppGpp Sens	Smc02655 UP Sens	
<i>vapBC2</i>	Smc01932-Smc01933	Smc01931 UP Antisens	smc06412 ARNnc Sens	
<i>vapBC3</i>	Smc01176-Smc01177	Smc01178 Protéine d'un système d'export putatif « multidrug » Antisens	Smc01175 Oxidoreductase putative Sens	ARNnc smc06544
<i>vapBC4</i> (<i>ntrPR</i>)	Smc03949-Smc01521	Smc01522 UP Antisens	Smc01520 UP Sens	
<i>vapBC5</i>	Smc00686-Smc00687	Smc00688 UP Antisens	SMc00684 UP Sens	
<i>vapBC6</i>	Smc03136-Smc03137	Smc03138 Kinase putative Antisens	Sms03135 Transporteur ABC putatif d'acides aminés, peptides Sens	
<i>vapBC7</i>	Smc04881-Smc04408	Smc07226 ARNnc	Smc04409 UP Sens	
<i>vapBC8</i>	Smc00392-Smc00393	Smc00391 UP Sens	Smc00394 GMP synthase putative Sens	
<i>vapBC9</i>	Smc00899-Smc00900	Smc00930 Protéine transmembranaire hypothétique Antisens	Smc00898 Protéine transmembranaire putative, canal potassium (KefB1) Sens	
<i>vapBC10</i>	Smc02987-Smc02988	Smc02986 Protéine transmembranaire hypothétique Antisens	Smc06911 ARNnc	
<i>vapBC11</i>	Smc02715-Smc02716	Smc02714 Protéine transmembranaire hypothétique Antisens	Smc02717 2-isopropylamate synthetase LeuA1 Sens	ARNnc Smc06767

Tableau 5 : Environnement génétique des systèmes VapBC chromosomiques de *S. meliloti*.

Les gènes situés en amont et en aval de chaque opéron TA sont décrits par leur nom et/ou numéro du gène, par leur fonction putative ou avérée, et, par leur sens de transcription par rapport au système TA correspondant. Les gènes des ARN non codant (ARNnc) situés au niveau de l'opéron TA (cadre de lecture différent) ou à proximité sont indiqués en rouge. UP : Protéine de fonction inconnue.

Sur la base des données portant sur la présence d'opérons TA complets, décrits dans la base de données TADB, il n'existe pas de systèmes VapBC sur les mégaplasmides. D'autre part, l'analyse de mutants dans les systèmes TA plasmidiques n'a pas révélée de phénotypes symbiotiques en interaction avec *M. sativa* (Milunovic et al., 2014). Nous avons donc concentré notre étude sur le rôle possible des systèmes TA chromosomiques de type II de *S. meliloti* lors de l'interaction avec sa plante hôte, en nous focalisant sur les 11 systèmes putatifs de la famille VapBC, pour les raisons évoquées plus haut. Le système NtrPR, également dénommé VapBC4, ayant déjà été caractérisé, nous nous sommes consacrés à l'étude des 10 systèmes non encore décrits.

B. Environnement génétique des opérons *vapBC* de *S. meliloti*

Sachant que (i) les modules TA peuvent être addictifs pour la cellule bactérienne, dans le cas où ils entraîneraient une mort cellulaire en cas de perte de l'opéron TA suite à des remaniements chromosomiques (délétion du module), et (ii) qu'ils pourraient jouer un rôle dans le maintien de certaines régions importantes du génome (voir Introduction Partie Toxine-Antitoxine), l'environnement génétique des différents opérons *vapBC* a été analysé dans la souche 2011 de *S. meliloti* (**Tableau 5**). Il en ressort que plusieurs opérons *vapBC* se situent à proximité de gènes codant des protéines de fonction inconnue, de protéines potentiellement impliquées dans l'export ou le transport de type ABC (*vapBC3*, *vapBC6*), de protéines de réponse au stress (*vapBC1*) ou d'ARN non codant (ARNnc ; *vapBC2*, *vapBC7*, *vapBC10*). Des ARNnc ont également été identifiés, en orientation inverse, dans la séquence codante de certains gènes de toxines (*vapC3*, *vapC11*).

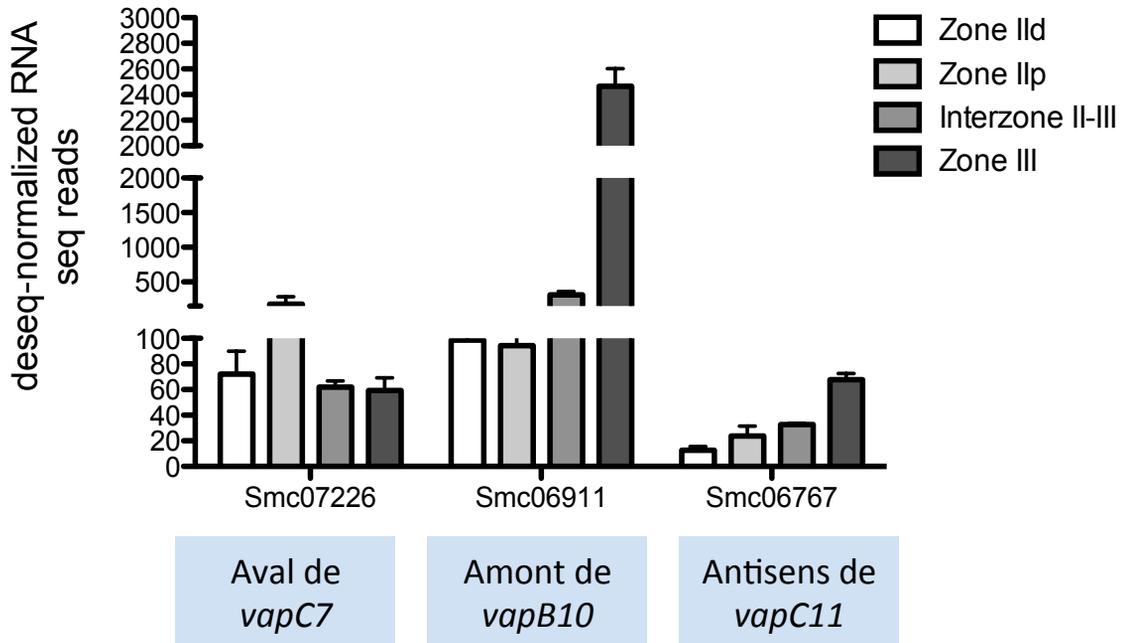
Il est notable de constater la présence, en amont de l'opéron *vapBC1*, du gène *relA* qui code une protéine de synthèse de l'alarmone ppGpp. En effet, comme décrit en introduction, RelA, catalysant la synthèse de ppGpp, déclenche la réponse stringente. Chez *S. meliloti*, il a été décrit que l'induction de *relA* a un rôle sur l'induction de gènes de réponse au stress, de gènes de modulation de la synthèse protéique mais aussi de gènes importants pour la symbiose comme *nifA* (Krol and Becker, 2011). De plus, chez *E. coli*, selon les souches considérées, il est notable de constater que le gène *relA* est associé à des gènes TA de classe II (MazEF et ChpAR) (Metzger et al., 1988). Une organisation du locus *relA-TA* est donc partagée par de nombreuses bactéries. Dans cette situation, il est possible que l'opéron TA

joue un rôle de « protection » de la région génique contenant le gène *relA*, gène essentiel à la réponse à un stress nutritionnel du à une carence en acides aminés, chez les bactéries en général et chez *S. meliloti*.

Quatre opérons *vapBC* sont situés en amont ou en aval de gènes codant des protéines membranaires hypothétiques ou une protéine d'export « multidrug » putative. Il est peu probable que cette proximité soit associée à la possibilité que les toxines de ces systèmes TA soient exportées. En effet, les toxines ne possèdent pas de peptides signaux et ne sont pas décrites, dans la littérature, pour être exportées hors de la cellule bactérienne. Le seul exemple de toxine d'un système TA potentiellement exporté par un système de sécrétion de type VI a été décrit chez *Pseudomonas aeruginosa* (Hood et al., 2010). La présence de gènes codant un système de sécrétion n'étant pas associée sur le génome aux gènes *vapBC* de *S. meliloti*, il est peu probable que les toxines VapC correspondantes soient sécrétées par ce moyen.

Les nouvelles approches de séquençage à haut débit pour réaliser des transcriptomes (RNAseq) ont permis de mettre en évidence chez les procaryotes (Tran et al., 2009), l'expression d'une grande diversité de transcrits non traduits (50 à 554 nucléotides) appelés ARN non codant (ARNnc) permettant, via des mécanismes d'appariement ARN cible/antisens, une régulation de l'expression des gènes. Les protéines régulatrices ne sont en effet pas les seuls éléments impliqués dans la régulation de l'expression de gènes bactériens. Un nombre important d'ARNnc ont récemment été annotés sur le génome de *S. meliloti* (Sallet et al., 2013; Robledo et al., 2015). Pour autant, peu d'informations sur l'expression de ces ARNnc sont disponibles, la plupart étant peu ou pas détectés dans les analyses transcriptomiques réalisées par RNAseq (Jimenez-Zurdo et al., 2012; Sallet et al., 2013; Robledo et al., 2015). Il est notable de constater que cinq gènes d'ARNnc sont présents dans l'environnement proches d'opérons *vapBC* (**Tableau 5**): trois sont en amont ou aval de ceux-ci (*vapBC2*, *vapBC7* et *vapBC10*) et deux sont positionnés en antisens dans le gène même de la toxine (*vapC3*, *vapC11*). Ces éléments pourraient participer à la régulation de l'expression des systèmes TA en ciblant l'ARNm de la toxine. Dans le cas particulier de *vapC3* et *vapC11*, l'ARNnc pourrait s'hybrider avec l'ARNm de la toxine, ce qui entrainerait la formation d'un ARN double brin, dégradé par la machinerie cellulaire, qui permettrait ainsi une diminution de l'expression de ces deux toxines ciblées. De façon intéressante, les études transcriptomiques disponibles (Sallet et al., 2013) révèlent une induction dans la nodosité en zone III de deux ARNnc associés aux gènes *vapBC*, celui situé en antisens de *vapC11* (Smc06767) et celui antisens aux gènes *vapBC10* (Smc06911). D'autre part, une induction en zone II est observée pour l'ARNnc situé en aval de l'opéron

A



B

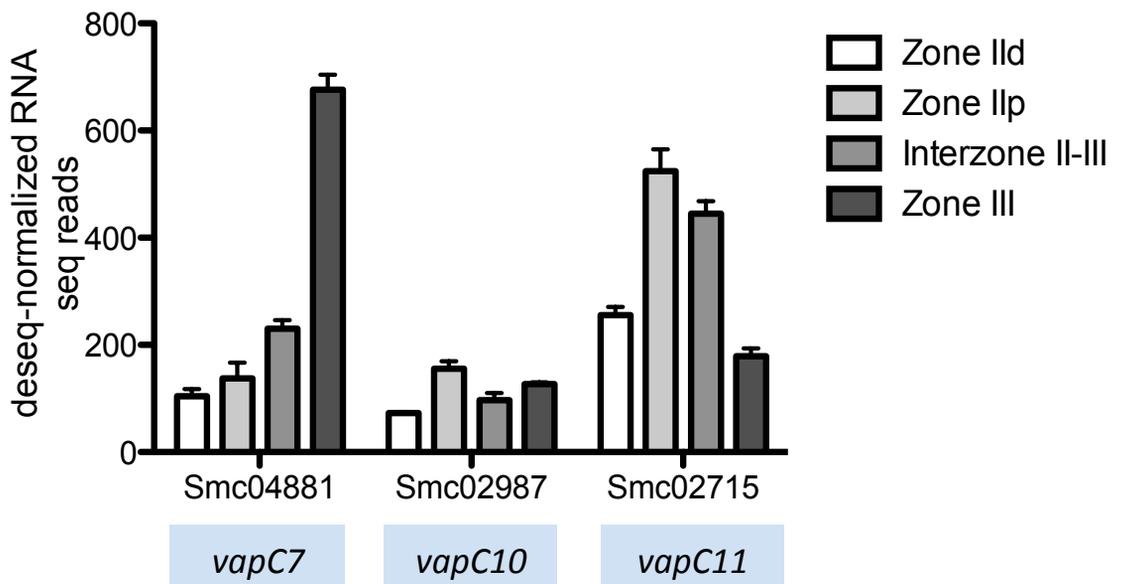


Figure 42 : Profil d'expression de gènes d'ARNnc et *vapC* proximaux chez *S. meliloti* dans les différentes zones de la nodosité de *M. truncatula*

Le niveau d'expression des gènes d'ARNnc et des gènes *vapC*7, 10 et 11 de *S. meliloti* dans les différentes zones de la nodosité a été déterminé par RNAseq (B. Roux *et al*, 2014). Les résultats obtenus sont exprimés en Deseq Normalized RNA (normalisation en fonction de la taille du transcrit, de la profondeur de lecture ainsi que d'une condition contrôle). La répartition de l'accumulation des transcrits en fonction des différentes zones de la nodosité est indiquée dans ce graphique. ZII d : Zone II d'infection distale; ZII p : Zone II d'infection proximale; IZ : Interzone II-III et ZIII : Zone III Fixatrice

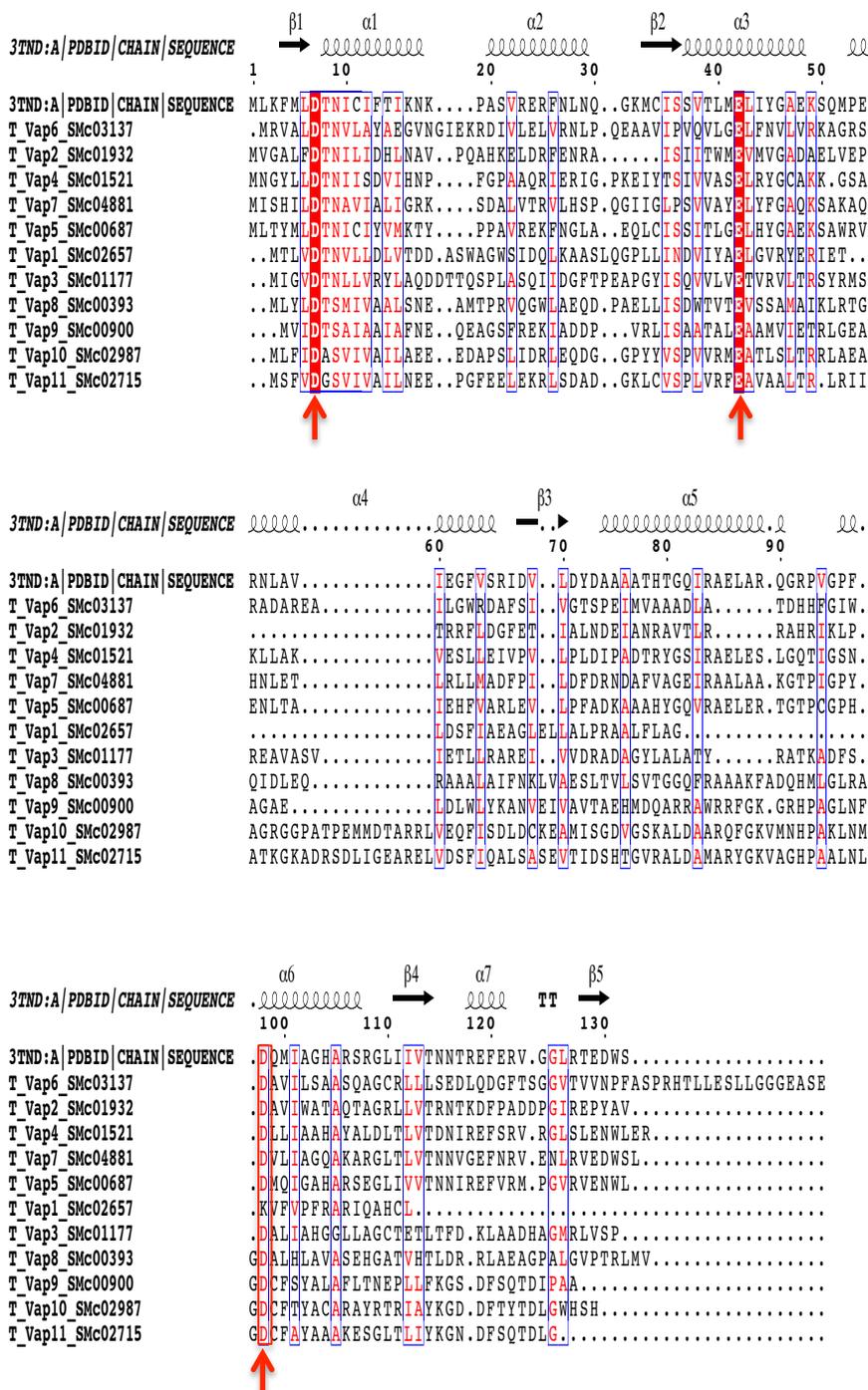


Figure 43 : Alignement des séquences protéiques des toxines VapC de *S. meliloti*

L'alignement des 11 séquences protéiques VapC putatives de *S. meliloti* a été réalisé à l'aide du logiciel d'alignement de séquences Muscle (Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>). La structure secondaire prédite a été déterminée en utilisant la structure de la protéine VapC de *S. flexneri* comme référence (PDB:3TND). Les acides aminés conservés formant le site catalytique sont encadrés en rouge. La représentation de l'alignement a été obtenue grâce au logiciel Esprout (Robert, X. and Gouet, P. 2014).

vapBC7 (Smc07226) (**Figure 42A**). La comparaison des profils d'expression de ces trois ARNnc avec ceux des opérons TA associés (**Figure 42B**) montre une certaine corrélation entre niveau élevé de l'expression du gène ARNnc et niveau bas d'expression du gène *vap* le plus proche pour : le gène *vapC7* (niveau d'expression le plus faible en zone II), les gènes *vapB10* et *vapC11* (niveau d'expression les plus faibles en zone III).

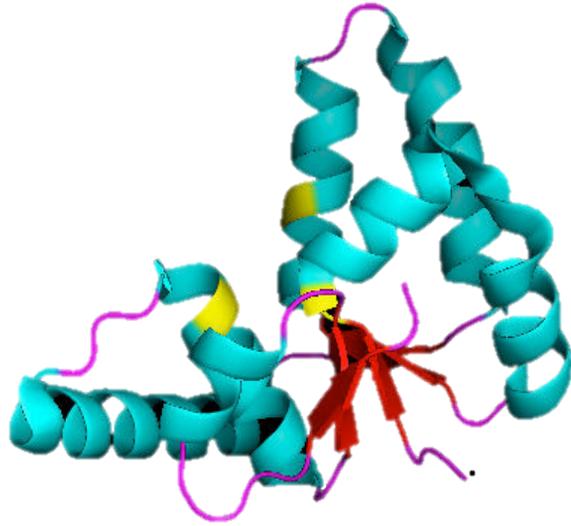
C. Homologies de séquences des protéines VapC et VapB et prédictions de structure tridimensionnelle

1. Les toxines VapC

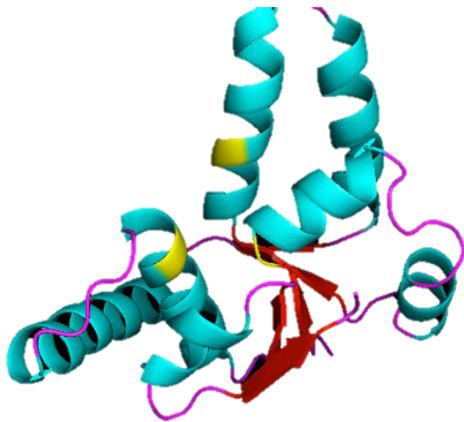
Un alignement des séquences primaires protéiques des 11 VapC de *S. meliloti* a été réalisé à l'aide des logiciels Muscle-Clustal et Esprout en utilisant la séquence protéique de la toxine VapC de *Shigella flexneri* comme référence (Dienemann et al., 2011). Un très faible pourcentage d'identité allant de 8,6 à 22% entre les séquences primaires des différentes VapC de *S. meliloti* prises deux à deux est observé (**Figure 43**), à l'exception des toxines VapC4, VapC5 et VapC7 où on note entre 35 et 40% de pourcentage d'identité entre elles. Comme décrit dans la littérature pour les autres toxines VapC d'autres espèces bactériennes (Arcus et al., 2011), la similitude se restreint essentiellement aux 3 acides aminés acides formant le site actif de la protéine (Daines et al., 2007; Dienemann et al., 2011; Das et al., 2014). La protéine VapC1 possède seulement 2 des 3 acides aminés acides conservés du fait de l'absence d'une partie de l'extrémité C terminale. La fonctionnalité de cette toxine est donc questionnable.

Comme rappelé en introduction, l'homologie entre les toxines VapC est plus significative au niveau des structures secondaires et tertiaires qu'au niveau des structures primaires. Aussi, une prédiction de la structure tridimensionnelle des 11 VapC de *S. meliloti*, a été réalisée à l'aide du logiciel Phyre2 en s'appuyant sur les données cristallographiques de la toxine VapC de *Shigella flexneri* (Dienemann et al., 2011), de la toxine VapC5 de *Mycobacterium tuberculosis* (Winther and Gerdes, 2012a) et de la toxine VapC de *Rickettsia felis* (Audoly et al., 2011). Trois d'entre elles sont présentées dans la **Figure 44**, à titre d'exemple. Toutes les VapC de *S. meliloti*, à l'exception de la protéine VapC1, possède une structure prédite similaire à celle des protéines cristallisées de référence. Elles présentent une structure globulaire compacte comprenant un repliement $\alpha/\beta/\alpha$ de 5 feuillets β et 7 hélices α ,

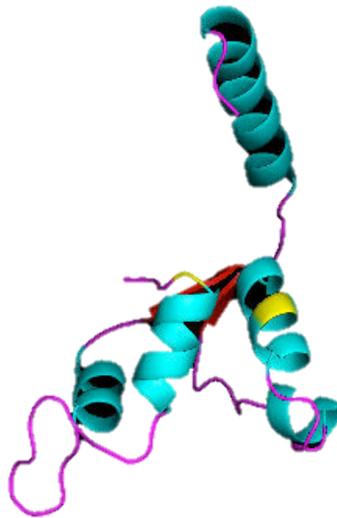
VapC *Shigella flexneri*



VapC4 (NtrR)



VapC1



VapC5

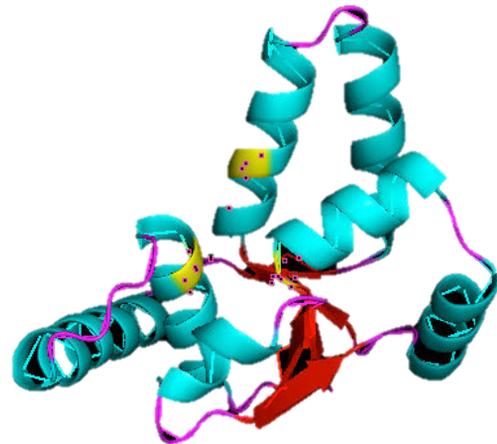


Figure 44 : Structures tridimensionnelles prédites de toxines VapC de *S. meliloti*.

La structure tridimensionnelle des toxines VapC4, VapC1 et VapC5 a été prédite à l'aide du logiciel phyre2 (Kelley LA and Sternberg MJE. *Nature Protocols* 2009) en utilisant la structure de la toxine VapC de *S. flexneri* comme référence (PDB:3TND). Représentation des prédictions de structures par le logiciel Pymol. Les hélices α sont indiquées en bleu et les feuillets β en rouge.

Les acides aminés formant le site catalytique sont indiqués en jaune.

Similitude de structure (RMSD Ca)	VapC 1	VapC 2	VapC 3	VapC 4	VapC 5	VapC 6	VapC 7	VapC 8	VapC 9	VapC 10	VapC 11
VapC <i>S. flexneri</i> (3TND)	1,372	2,808	4,83	0,276	0,331	14,24	0,330	14,45	8,841	4,667	3,189
VapC5 <i>M. tuberculosis</i> (3DBO)	11,89	2,831	10,69	0,838	0,821	5,664	0,796	5,284	7,069	7,92	9,029

Tableau 6 : Comparaison de la structure tridimensionnelle prédite des VapC de *S. meliloti* à celles des toxines VapC de *Shigella flexneri* et VapC5 de *Mycobacterium tuberculosis*.

Les valeurs de RMSD (Root-mean-square-deviation) ont été calculées par superposition de la structure de la toxine VapC de *S. flexneri* (3TND) ou VapC5 de *M. tuberculosis* (3DBO) sur les structures prédites des VapC de *S. meliloti* à l'aide du logiciel PyMol. Une valeur de RMSD faible traduit une forte similitude.

Les toxines VapC4, VapC5 et VapC7 présentent une forte similitude entre elles et vis-à-vis des 2 toxines de référence.

caractéristique des protéines à domaine PIN. La protéine VapC1, de taille plus petite, ne dispose quant à elle que de 4 feuillets β , ce qui lui confère une structure beaucoup moins compacte que celle habituellement observée.

Pour compléter cette analyse structurale, la similitude des structures tridimensionnelles prédites des VapC de *S. meliloti* par rapport à deux toxines cristallisées, VapC de *S. flexneri* (Dienemann et al., 2011) et VapC5 de *M. tuberculosis* (Winther and Gerdes, 2012) a été calculée grâce à la détermination du RMSD (Root Mean Square Deviation). On remarque ainsi que les toxines VapC4, VapC5 et VapC7 sont les plus proches en structure des toxines prises comme référence. Elles sont également proches entre elles, au vu des scores similaires (**Tableau 6**).

Afin de mieux caractériser le site catalytique des différentes toxines, une analyse des blocs hydrophobes (« Hydrophobic Cluster Analysis »), a permis de réaliser une représentation en deux dimensions de la structure tridimensionnelle prédite de chaque protéine, permettant de définir l'environnement autour des acides aminés acides du site actif putatif. Il en ressort que les 3 acides aminés acides conservés sont, pour toutes les VapC de *S. meliloti*, retrouvés au sein d'une poche hydrophobe, ce qui est en faveur de leur implication dans la constitution du site actif (Résultats non montrés). Enfin, une analyse phylogénétique permettant la comparaison des 11 VapC putatives de *S. meliloti*, a également été réalisée (**Figure 45**). Bien que l'apparition des opérons TA dans les génomes bactériens soit encore aujourd'hui sujette à controverse, il semble que les toxines VapC4, VapC5 et VapC7 d'une part et les toxines VapC9, VapC10 et VapC11 d'autre part, aient une origine commune. Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que, dans ces deux groupes, les gènes de ces 3 toxines soient issus d'un même gène par un processus de duplication, ce qui est en parfait accord avec notre résultat de RMSD pour les toxines VapC4, VapC5 et VapC7 (**Tableau 6**).

En conclusion, les analyses bioinformatiques réalisées ont permis de montrer que toutes les toxines VapC putatives de *S. meliloti* présentent une structure similaire, caractéristique des toxines VapC, comprenant un domaine PIN défini par un site actif composé de 3 acides aminés acides conservés situés dans une poche hydrophobe. Parmi ces 11 toxines VapC, il est important de noter que la toxine VapC1 se distingue par une taille plus petite, une structure moins compacte et surtout l'absence d'un des acides aminés acides du site catalytique. Aussi, il sera d'autant plus important pour VapC1 de vérifier expérimentalement la fonctionnalité de la toxine.

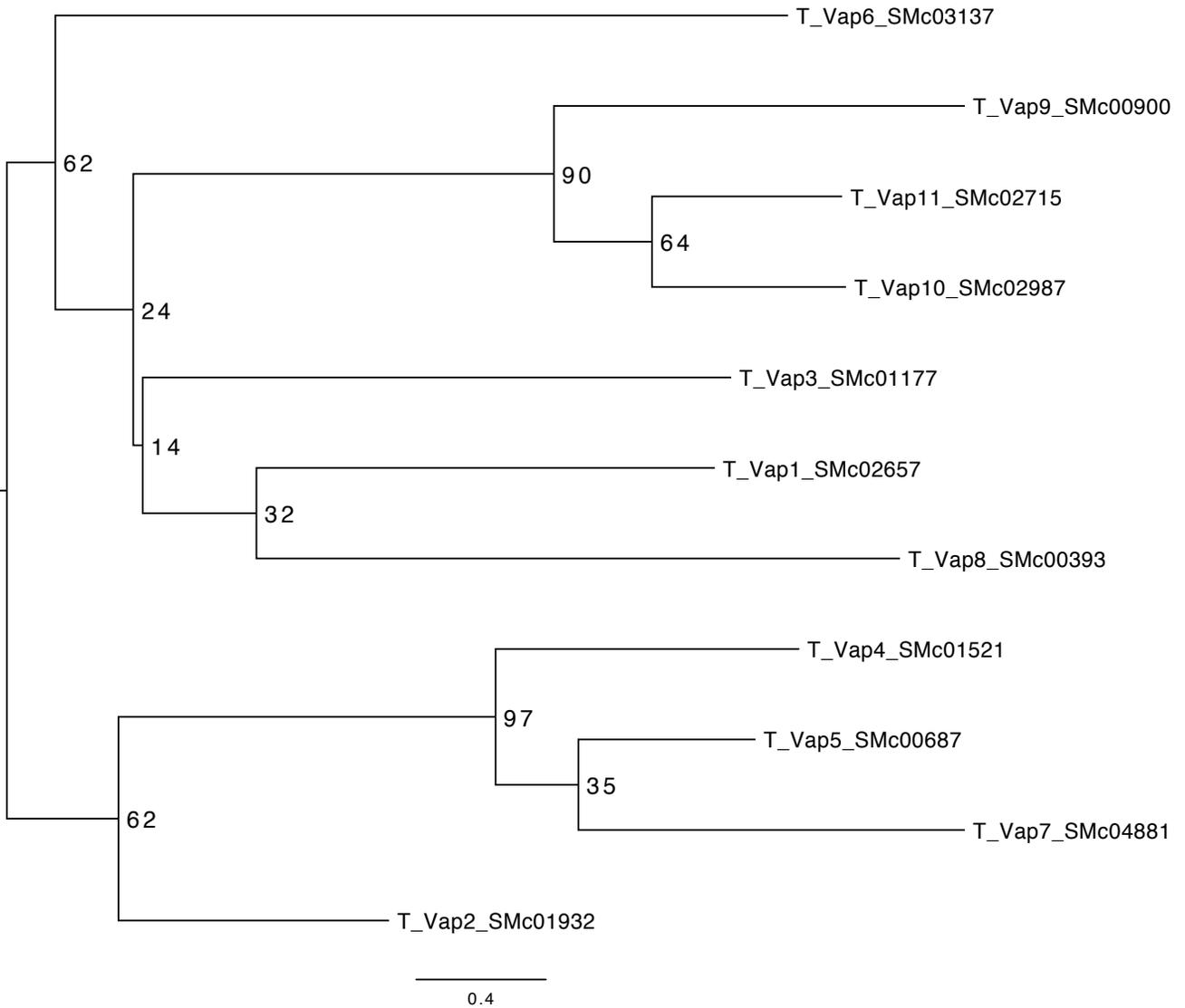


Figure 45 : Arbre phylogénétique des toxines VapC de *S. meliloti*

L'étude phylogénétique a été réalisée suivant la méthode du maximum de vraisemblance (logiciel PROTTEST) à partir de l'alignement protéique présenté **en figure 43**. Il est à noter que l'arbre n'est pas enraciné car aucun exogroupe n'a été fourni.

Seuls les valeurs d'embranchements supérieures à 50 sont significatives.

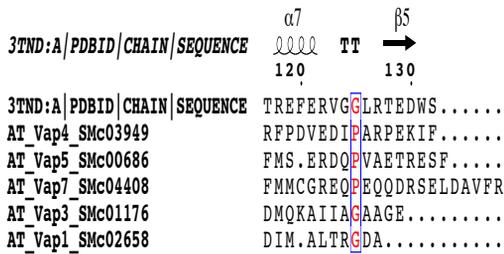
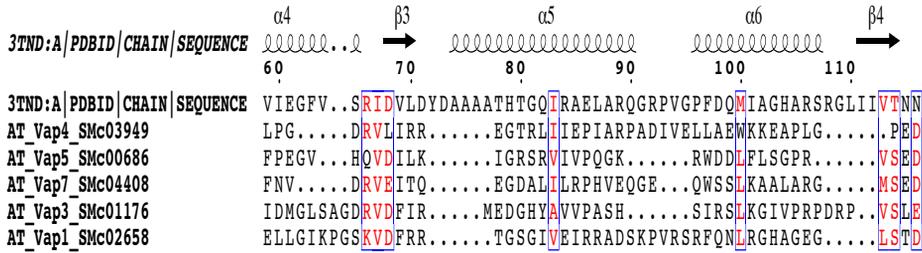
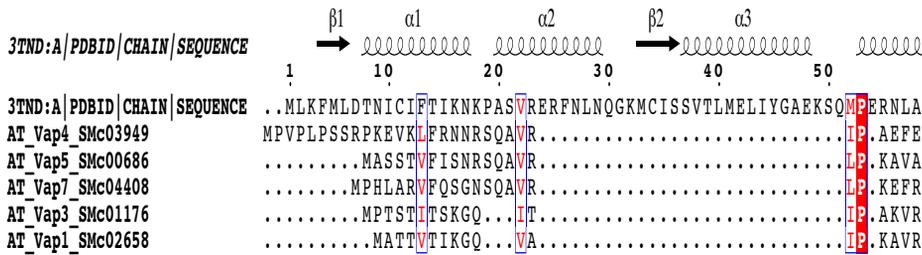


Figure 46 : Alignement des séquences protéiques des antitoxines VapB à domaine AbrB-like de *S. meliloti*.

L'alignement des 5 séquences protéiques VapB/AbrB-like putatives de *S. meliloti* a été réalisé à l'aide du logiciel d'alignement de séquences Muscle (MULTiple Sequence Comparison by Log-Expectation; <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>). La structure secondaire prédite a été déterminée en utilisant la structure de la protéine VapB de *S. flexneri* comme référence (PDB: 3TND). Les acides aminés conservés sont indiqués en rouge. La représentation de l'alignement a été obtenue grâce au logiciel Esprict (Robert, X. and Gouet, P. 2014).

2. Les antitoxines VapB

Comme pour les toxines, une comparaison des séquences primaires des différentes antitoxines VapB de *S. meliloti* a été réalisée, à l'aide des logiciels Muscle et Esprout. Toutefois, les séquences primaires des antitoxines étant très différentes les unes des autres, elles ont été préalablement regroupées dans différentes familles suivant leur site de liaison à l'ADN (**Figure 46; 47 A/B**). En effet, rappelons que le complexe protéique Toxine-Antitoxine se fixe à l'ADN grâce à des domaines de liaison présents sur l'antitoxine. Chez *S. meliloti*, les domaines de liaison à l'ADN des protéines d'antitoxines appartiennent à 3 classes distinctes : AbrB-like (pour VapB1, 3, 4, 5 et 7), PHD (pour VapB8 et 6) et RHH (pour VapB2, 9, 10 et 11) (Coles et al., 2005).

Nous constatons que même regroupées en familles de liaison à l'ADN, les antitoxines VapB présentent une faible conservation au niveau de leur séquence protéique primaire. Entre les antitoxines à domaine AbrB (**Figure 46**), un pourcentage d'identité allant de 12 à 37% est observé (entre VapB4, VapB5 et VapB7), il est de 27,8% entre les deux VapB à domaine PHD (**Figure 47A**) et enfin de 14 à 40% entre les antitoxines à domaine RHH (**Figure 47B**) avec un maximum de pourcentage d'identité entre VapB10 et VapB11. D'autre part, il nous est difficile, grâce au logiciel Phyre2 de prédire leurs structures secondaires ou tertiaires car seules 2 antitoxines ont été cristallisées (VapB5 de *M. tuberculosis* et VapB *S. flexneri*) et ces deux antitoxines ne possèdent pas le même domaine de liaison à l'ADN. Il semble toutefois que les antitoxines VapB présentent une réelle diversité de structures protéiques. Sachant que des réactions croisées entre les systèmes TA différents sont possibles, ces interactions pourraient être plus probables entre systèmes TA dont les antitoxines ont un même domaine de liaison à l'ADN. Ainsi, la meilleure homologie de séquence étant détectée entre les antitoxines à domaine de liaison à l'ADN de type RHH, des régulations croisées pourraient avoir lieu entre les systèmes VapBC10 et VapBC11 et de même entre les systèmes VapBC4, VapBC5 et VapBC7 au vue de l'homologie de la séquence protéique des VapB et VapC.

A

```

      1      10      20      30      40      50
AT_Vap8_SMc00392 .MDAVNLAADAKAHLSELVDRVEACDSIEITRRGKPVARLTAVARPRKRITDALLQSLTAT
AT_Vap6_SMc03136 MEAVSAADANRKFSLILRSVRECHSYVVTSHGRPVARIVPAAKSDNAVSGARTALSLRL

      60      70      80
AT_Vap8_SMc00392 MPLOSGSAADLVRS.MRDDDRY
AT_Vap6_SMc03136 ERQPAVIAGRWTRDELVEDEER.

```

B

```

      1      10      20      30      40      50
AT_Vap2_SMc01933 MRALIDMNDTQVEALDTAKRVR.RSRAALIRPNTDDYLNHH...REQTEDGFGTL.
AT_Vap9_SMc00899 ..MALSIKDTETEQLARTRARRTG.ESITLTKRALERLRRTDTAARRAALLDLEAIQ
AT_Vap11_SMc02716 ..MALYIKDPTVDRMAEKIQEIRLGVRTKTDAVRTALQHELDNVEDEIPLREKLAALRQQA
AT_Vap10_SMc02988 ..MPLYIKDPEVDRLAELIISLTK.SSKVDAVKDALKHEIAKRRKAVLPVRERLAKSLAMA

      60      70
AT_Vap2_SMc01933 [.WGKRKVDGLAYQEKVRGEW...
AT_Vap9_SMc00899 RRWNAMPVLDSSRSSDDIIGYDEEDGLPS
AT_Vap11_SMc02716 RDRLGPPVHGLDMKKLMDELWEEGE..
AT_Vap10_SMc02988 REAG...PFAPGNHKKRETDMMGDD...

```

Figure 47 : Alignement des séquences protéiques des antitoxines VapB à domaine PHD et RHH de *S. meliloti*.

L'alignement des séquences protéiques VapB/PHD (A) et VapB/RHH putatives de *S. meliloti* a été réalisé à l'aide du logiciel d'alignement de séquences Muscle (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>).

Les acides aminés conservés sont indiqués en rouge. La représentation de l'alignement a été obtenue grâce au logiciel Esript (Robert, X. and Gouet, P. 2014).

Toxine	Gène	Toxicité chez <i>E. coli</i> estimée par ^a CFU/ml ou ^b mesure de DO _{600nm}
vapC1	smc02657	Non toxique ^{a,b*}
vapC2	smc01932	ND
vapC3	smc01177	ND
vapC4	smc01521	Toxique ^{a, b} (<i>Bodogai et al. 2001</i>)
vapC5	smc00687	Toxique ^{a, b} (<i>Lipuma et al. 2014</i>)
vapC6	smc03137	ND
vapC7	smc04881	Toxique ^{a, b}
vapC8	smc00393	Toxique ^{a*}
vapC9	smc00900	Toxique ^b
vapC10	smc02987	Toxique ^{a*}
vapC11	smc02715	ND

Tableau 7 : Tableau récapitulatif des tests de toxicité des toxines VapC chez *E. coli*

Les souches d'*E. coli* portent les plasmides pBAD24 recombinants (gène *vapC* sous le contrôle du promoteur *pBAD*) ont été cultivées en milieu LB jusqu'à une DO_{600nm} de 0,2 puis l'arabinose à 1% a été ajouté ou pas pendant 4H. Un contrôle négatif a été réalisé avec la souche portant le plasmide vide. La toxicité de la protéine VapC surproduite est déterminée par mesure de la viabilité (CFU/ml) et/ou par mesure de croissance (DO_{600nm}). Les gènes *vapC* dont les tests de toxicité n'ont pas encore été réalisés (clonages en cours) sont annotés ND. Les expériences à répéter sont indiquées par *

D. Démonstration fonctionnelle des systèmes Toxine Antitoxine VapBC putatifs de *S. meliloti*

Les systèmes VapBC putatifs de *S. meliloti* ont été identifiés sur la base de leurs homologies de séquences avec des systèmes VapBC connus. L'analyse bioinformatique que nous avons entreprise (prédiction des séquences tertiaires et étude de similitude avec des toxines connues, caractérisation de l'environnement hydrophobe du site actif) conforte cette identification. Pour autant, il est essentiel de confirmer de façon indiscutable la nature et la fonction de ces systèmes. Aussi, pour chaque toxine VapC de *S. meliloti*, la démonstration de l'activité toxique a été entreprise chez *E. coli*. Pour cela, le clonage des gènes codant les toxines VapC putatives de *S. meliloti* a été réalisé dans un vecteur d'expression inductible à l'arabinose (pBAD24) et introduit chez *E. coli*. La viabilité des souches résultantes a ensuite été testée en suivant l'absorbance à 600 nm des cultures, après induction de l'expression de la toxine par l'arabinose. Un aliquot de chaque culture a d'autre part été étalé, à différentes dilutions, sur milieu gélosé riche afin de dénombrer le nombre de colonies obtenues (CFU/ml) (**Tableau 7**).

A ce jour, des expériences préliminaires, à renouveler, ont été réalisées sur 5 gènes *vapC* (*vapC1*, *vapC7*, *vapC8*, *vapC9* et *vapC10*) qui ont été clonés dans le vecteur d'expression pBAD24 et la viabilité des souches d'*E. coli* correspondantes testée (**Tableau 7**). Un exemple de résultat de viabilité est représenté dans la **Figure 48**. La toxicité de VapC4 (= NtrR) et VapC5 ayant préalablement été démontrée (Bodogai et al., 2006; Lipuma et al., 2014), la stratégie décrite ci-dessus n'a pas été développée pour ces deux toxines. Enfin, le clonage des gènes des toxines VapC2, VapC3 et VapC6 et VapC11 dans le vecteur d'expression, est actuellement en cours de réalisation.

D'après ces expériences préliminaires, il en ressort que la toxine VapC1 ne présente pas d'effet toxique chez *E. coli*, ce résultat n'est pas surprenant car suite à l'analyse de sa séquence et de sa structure, nous avons pu montrer qu'elle a une structure tronquée avec un acide aminé du site catalytique absent.

En conclusion, bien que ces résultats soient préliminaires, ils nous ont permis pour certaines toxines de valider et pour d'autres toxines de suggérer (expériences à confirmer) la fonction toxique de ces toxines VapC (7 sur 11). La toxicité des toxines VapC2, VapC3 et VapC6 et VapC11 restent à réaliser. La démonstration de l'effet toxique par expression des toxines VapC chez *E. coli* est une façon de démontrer que ces systèmes TA putatifs, sont

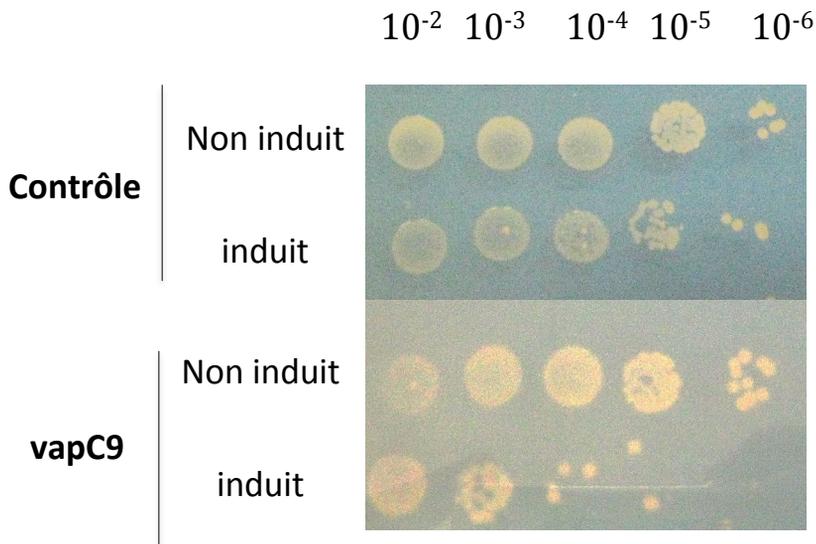


Figure 48 : Exemple de test de viabilité réalisé chez *E. coli* par surexpression de la toxine VapC9

La viabilité des souches *d'E. coli* exprimant la toxine VapC9 de *S. meliloti* est estimée en déterminant le nombre de colonies formées sur milieu LB après 48H d'un dépôt de 10 μ L d'une dilution sérielle de la culture bactérienne induite ou non par 1% d'arabinose pendant 4H. Une souche *d'E. coli* transformée avec le vecteur d'expression pBAD24 vide est utilisée en contrôle.

fonctionnels. Il faudrait compléter cette analyse en co-exprimant la toxine avec son antitoxine afin de démontrer la fonction complète du module.

II. Profil d'expression des opérons *vapBC* de *S. meliloti*

La multiplicité des systèmes Toxine Antitoxine chez *S. meliloti* qui s'accompagne, comme nous l'avons vu, d'une variabilité structurale pourrait, comme cela a été proposé chez *M. tuberculosis*, s'expliquer par des fonctions distinctes, en réponse à des stimuli différents, de chacun de ces systèmes (Ramage et al., 2009). Afin d'étudier cette hypothèse, nous avons analysé *in silico* l'expression de chaque opéron en culture pure ou *in planta* dans les différentes zones de la nodosité fonctionnelle (Roux et al., 2014).

A. Expression des opérons TA *vapBC* en culture

Des expériences réalisées au laboratoire sur deux opérons *vapBC* (5 et 7) ont montré, par RT-qPCR une faible expression de ces systèmes en culture pure (résultats non montrés). Afin d'avoir une vision plus globale de l'expression de l'ensemble des gènes *vapBC* de *S. meliloti*, l'analyse *in silico* d'une étude transcriptomique menée chez *S. meliloti* (Sallet et al., 2013) a été réalisée afin de comparer le profil d'expression des 11 opérons *vapBC* en phase stationnaire et exponentielle de croissance, en nous focalisant plus particulièrement sur les gènes *vapC* (**Figure 49**). Un différentiel d'expression significatif entre certains des 11 gènes *vapC* de *S. meliloti* est visible. En effet, nous observons que le gène *vapC1* n'est que très peu exprimé en culture pure notamment en phase stationnaire. Une stimulation de l'expression des gènes *vapC7*, *vapC6* et *vapC4* de, respectivement, environ 5, 4 et 3 fois en phase stationnaire par rapport à la phase exponentielle est observé. Ceci suggère qu'un des signaux d'induction de ces systèmes puisse être la carence nutritionnelle ressentie par la bactérie en phase stationnaire. En conclusion, hormis le gène *vapC1* réprimé en phase stationnaire, et les gènes *vapC3* et *vapC8*, pas ou peu exprimés en culture, les gènes *vapC* sont globalement surexprimés en phase stationnaire par rapport à la phase de croissance exponentielle, notamment le gène *vapC7*.

Toxine	Gène	Moyennes des valeurs	Moyennes des valeurs	Facteur	p-value
		de RPKM en croissance exponentielle	de RPKM en phase stationnaire	d'induction Stat/Expo	
VapC7	SMc04881	116,33	395,67	5,35171022	1,63E-38
VapC6	SMc03137	72,67	193,33	4,22807216	3,25E-19
VapC4	SMc01521	99,67	204,67	3,18214594	2,92E-14
VapC2	SMc01932	246,00	407,00	2,5668518	7,20E-14
VapC9	SMc00900	77,33	103,67	2,11403608	1,92E-05
VapC5	SMc00687	299,00	373,67	2	4,25E-06
VapC11	SMc02715	183,33	198,33	1,72907446	2,41E-04
VapC10	SMc02987	83,00	88,67	1,67017584	4,25E-03
rpoH1	SMc00646	1502,00	587,33	0,6328783	7,31E-05
VapC1	SMc02657	50,00	4,33	0,15177436	6,56E-06
nifA	SMA0815	1,00	1,67	3,18214594	4,50E-01
VapC3	SMc01177	96,33	83,00	1,39474367	1,29E-01
VapC8	SMc00393	78,00	58,67	1,18099266	4,92E-01

Figure 49 : Profil d'expression des 11 gènes codant les toxines VapC de *S. meliloti* au cours de la croissance bactérienne (étude *in silico*).

L'expression des 11 gènes des toxines *vapC* de *S. meliloti* a été déterminée en phase de croissance exponentielle ou stationnaire par une approche RNAseq (Sallet, E. *et al.* 2013). Un facteur d'induction est déterminé pour chaque gène *vapC* en comparant les mesures d'expression en RPKM (Reads Per Kilobase per Million mapped reads) réalisées en triplicate en condition de phase stationnaire et exponentielle. L'expression des gènes *nifA* (peu ou pas exprimé en culture pure) et *rpoH1* (fortement exprimé en culture pure) a été utilisée comme référence. Les valeurs sont significatives pour une p value < 5.10⁻³

B. Expression des opérons *vapBC* dans les différentes zones de la nodosité fonctionnelle

L'analyse par séquençage (RNAseq) du niveau de transcrits des gènes dans différentes zones de la nodosité, isolées par microdissection laser (ZIIId : Zone II distale; ZIIp : Zone II proximale ; IZ : Interzone II-III et ZIII : Zone III ; **Figure 50**) a permis l'obtention de 942 millions de lectures séquences qui ont ensuite été reportées sur les génomes de *M. truncatula* et *S. meliloti* (Roux et al., 2014). La mise en ligne des résultats permet d'obtenir le profil d'expression des 11 opérons *vapBC* dans ces différentes zones (<https://iant.toulouse.inra.fr/symbimics/>). La zone I n'a pas été considérée dans l'interprétation car cette zone n'est pas censée être infectée (zone de contamination par les bactéries).

Ainsi, nous avons comparé les valeurs permettant une quantification de l'expression des gènes, à partir du séquençage des ARN et après normalisation par la totalité des longueurs et la profondeur des lectures de séquençage, des différents opérons *vapBC* de *S. meliloti* dans les zones I/II/III (**Figure 51**).

Grâce à la première analyse correspondant à l'expression dans les différentes zones de nodosités âgées de 15 jours post-inoculation, nous pouvons classer les profils d'expression des différents opérons TA *vapBC* en trois catégories : i) les modules exprimés plus fortement en zones II et interzone II-III (*vapBC2*, *vapBC5*, *vapBC6*, *vapBC8*, *vapBC10* et *vapBC11*), ii) les systèmes exprimés de façon homogène mais faiblement dans les différentes zones de la nodosité (*vapBC1*, *vapBC3*, *vapBC4* et *vapBC9*) et enfin iii) le cas de l'opéron *vapBC7* dont la toxine présente une forte expression en zone III. A noter, qu'il est parfois observé pour un même opéron TA, un profil d'expression différent pour la toxine et l'antitoxine. Une hypothèse pour expliquer cette différence est que la toxine pourrait cibler l'ARNm de sa propre antitoxine.

Ces analyses *in silico* des profils d'expression des opérons *vapBC* dans différentes zones de la nodosité, nous permettent d'apporter des éléments de réponse à notre hypothèse sur la diversité de ces systèmes dans le génome de *S. meliloti*. En effet, le fait d'observer des profils d'expression différents pour ces opérons indique qu'ils ne répondent pas aux mêmes signaux, puisqu'ils ne sont pas induits au même moment au cours de l'interaction symbiotique. Par la suite, il serait donc intéressant de voir si les opérons TA présentant le même profil d'expression dans la nodosité ont le même rôle dans l'interaction symbiotique. Est-ce que cette variabilité d'expression est corrélée à une variabilité de rôles biologiques ?

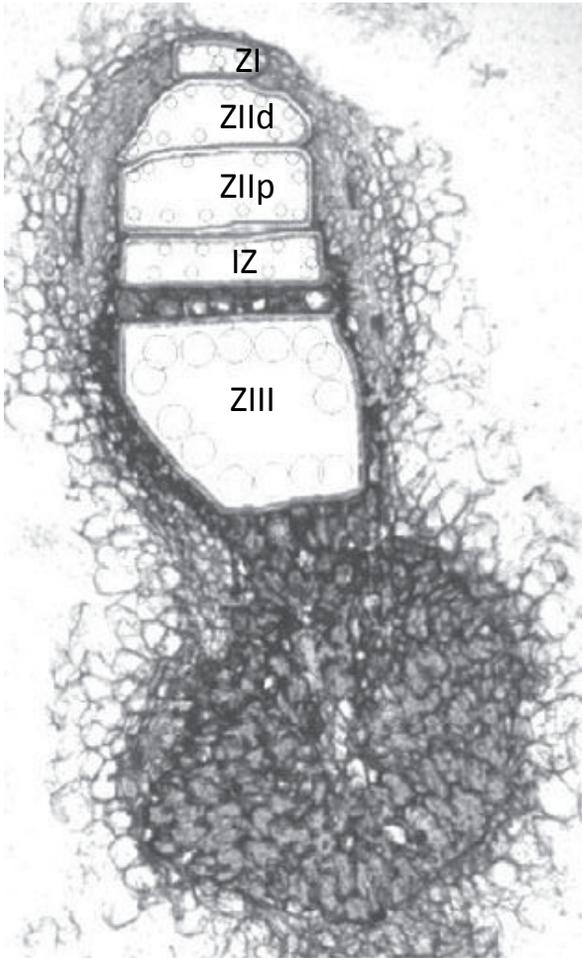


Figure 50 : Zones structurales de la nodosité fonctionnelle (15 jours post-inoculation) de *M. truncatula* induite par la souche 2011 de *S. meliloti*, découpées par microdissection laser (B. Roux et al. 2014).

ZI : Zone I méristématique; ZII d : Zone II d'infection distale; ZII p : Zone II d'infection proximale; IZ : Interzone II-III et ZIII: Zone III Fixatrice

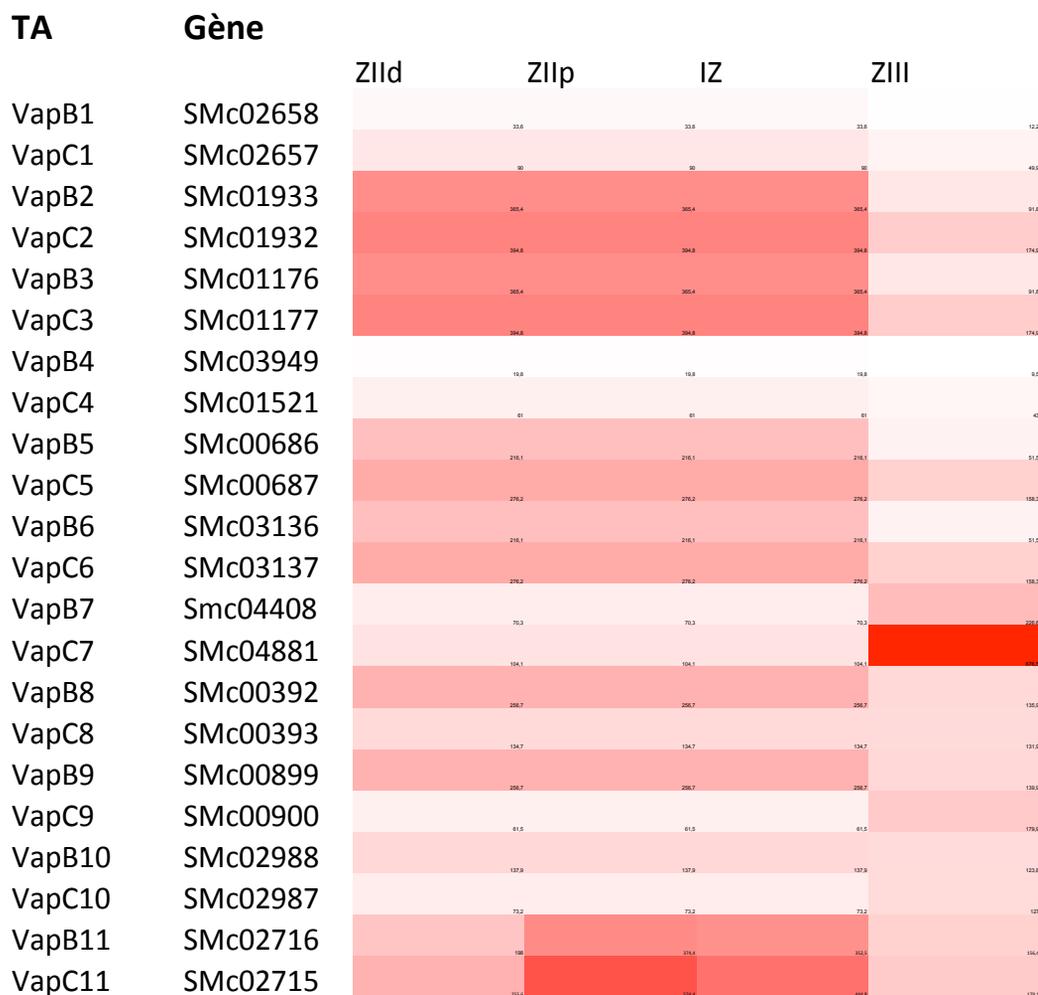


Figure 51 : Profil d'expression des gènes *vapBC* de *S. meliloti* dans la nodosité

Le niveau d'expression des gènes codant les toxines VapC et les antitoxines VapB de *S. meliloti* dans les différentes zones de la nodosité a été déterminé par RNA seq (B. Roux *et al*, 2014). Les résultats obtenus sont exprimés en Deseq Normalized RNA (normalisation en fonction de la taille du transcrit, de la profondeur de lecture ainsi que d'une condition contrôle). Plus la valeur est élevée, plus l'expression est importante.

ZIId : Zone II d'infection distale; ZIIp : Zone II d'infection proximale; IZ: Interzone II-III et ZIII: Zone III Fixatrice

III. Phénotypes des mutants d'inactivation de la toxine des différents systèmes VapBC de *S. meliloti*

Afin de préciser le rôle de chaque système VapBC de *S. meliloti*, nous avons entrepris l'étude du phénotype des mutants d'inactivation de la toxine de chaque système, en culture pure et en symbiose avec la plante modèle *Medicago truncatula*.

Pour cette étude, des mutants des gènes *vapC2*, *vapC5* et *vapC7* issus de banques de mutants obtenus par insertion d'un mini-transposon Tn5 sont utilisés (Pobigaylo et al., 2006). Des mutants d'inactivation pour 7 gènes *vapC* de *S. meliloti* ont été réalisés au cours de cette étude, grâce à l'intégration, par recombinaison homologue, d'un fragment interne du gène de la toxine en lieu et place du gène endogène (**Figure 52**). Les fragments internes au gène *vapC*, amplifiés et clonés dans le vecteur suicide pK19mob2, sont décrits dans la Section Matériel et Méthodes. Le mutant *vapC4* (NtrR) ayant déjà été étudié pour son phénotype en interaction symbiotique avec *M. sativa*, ce mutant n'a pas été étudié à nouveau dans cette approche (Bodogai et al., 2006).

A. Phénotype des mutants d'inactivation des toxines VapC de *S. meliloti* en culture

La croissance des 10 souches *vapC* mutantes de *S. meliloti* a été comparée, lors d'une étude cinétique en milieu liquide riche LB, à celle du sauvage (WT 2011). Aucune différence significative n'est observée pour aucun des mutants *vapC* par rapport à la souche WT, avec simplement une tendance à une croissance un peu plus rapide pour le mutant *vapC3* mais ce phénotype n'a pas été confirmé sur les trois répliques (**Figure 53**). L'analyse *in silico* de l'expression des différents systèmes VapBC au cours de la culture bactérienne (phase exponentielle/phase stationnaire) avait révélé des profils différents suivant les systèmes étudiés (**Figure 49**), toutefois, le niveau d'expression était dans tous les cas toujours très faible, ceci pourrait, au moins partiellement, expliquer l'absence de phénotype constaté.

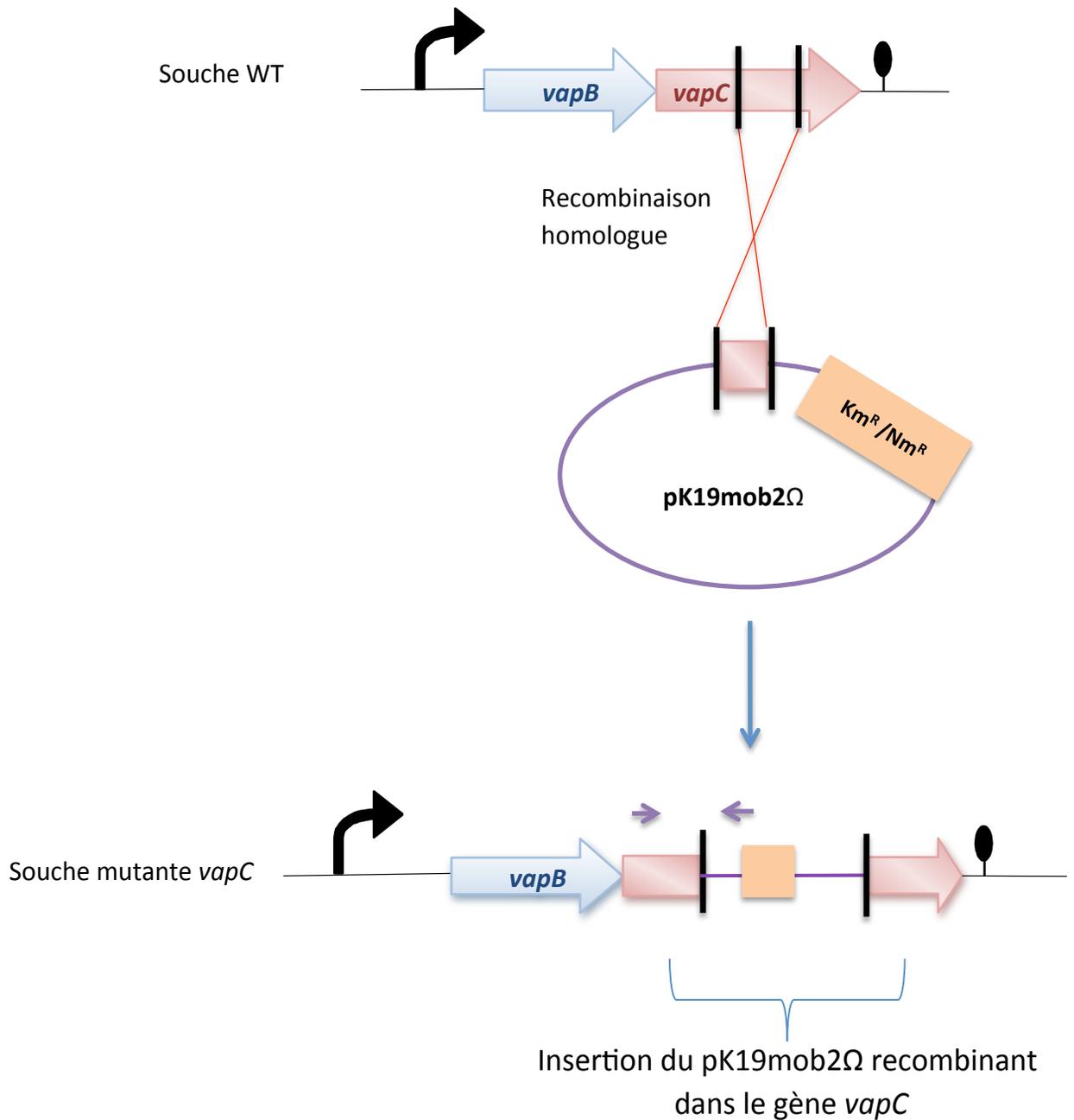


Figure 52 : Construction de mutants d'inactivation de la toxine VapC

Les gènes des toxines *vapC* de *S. meliloti* sont invalidés grâce à l'insertion, par recombinaison homologue, du plasmide pK19mob2 contenant un fragment interne du gène ciblé. La mutation est introduite dans la souche WT de *S. meliloti* par conjugaison. L'insertion du plasmide d'inactivation est contrôlée par PCR à l'aide d'amorces situées dans le gène *vapC* et l'autre sur le plasmide inséré (flèches violettes). Les acides aminés conservés du site catalytique de la toxine VapC sont indiqués par les lettres correspondantes D (Acide aspartique) et E (Acide glutamique) en rouge.

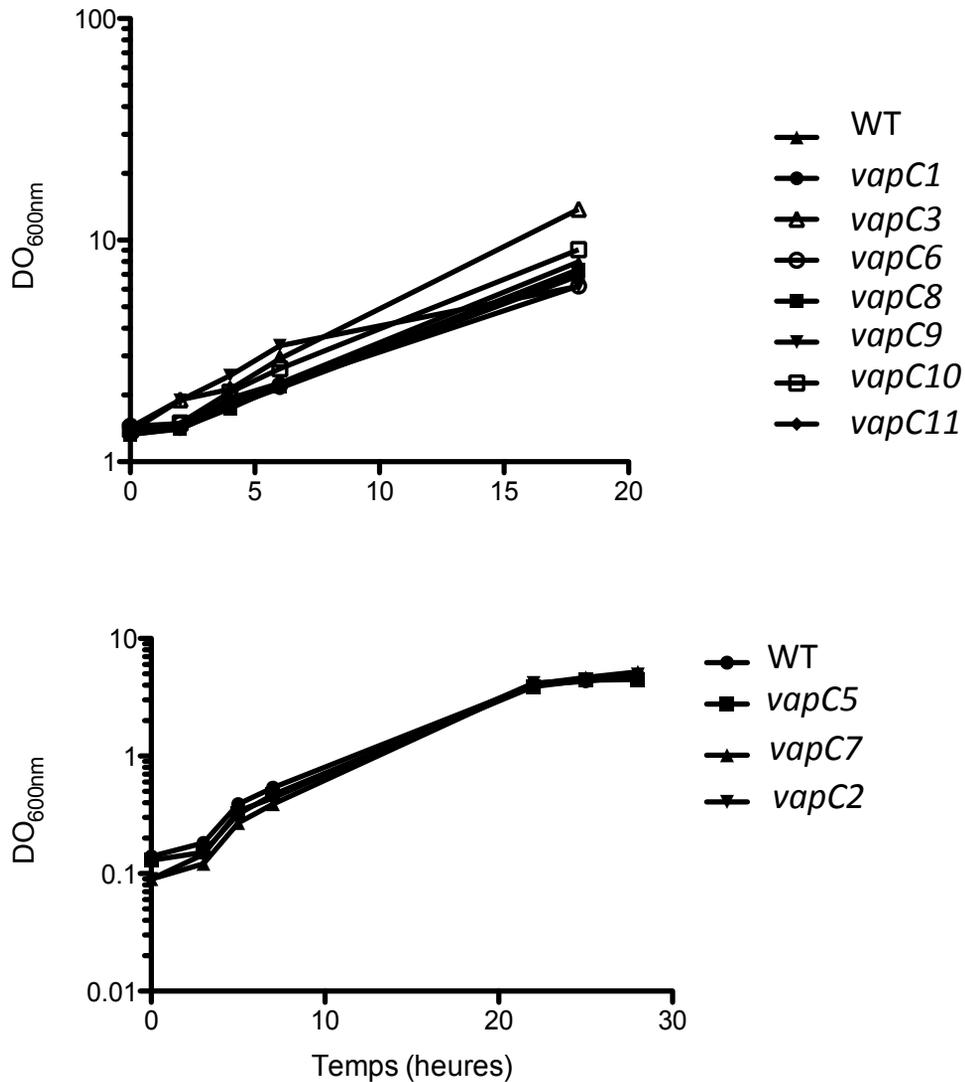


Figure 53 : Courbes de croissance des mutants d'inactivation de la toxine VapC (*vapC*) et de la souche sauvage (WT2011)

Les croissances sont réalisées en milieu liquide riche (LBmc) à 30°C. La croissance est suivie par la mesure de l'absorbance à 600nm. Ces croissances ont été réalisées en triplica. Le graphique représente les résultats significatifs d'un de ces triplica.

B. Phénotype des mutants d'inactivation des toxines VapC de *S. meliloti* en symbiose avec *M. truncatula*

L'étude du phénotype symbiotique des mutants *vapC* en interaction avec *M. truncatula* a été réalisée après 6 semaines d'inoculation et comparé à celui de plantes inoculées par la souche sauvage au niveau : du rendement végétal (estimé par la taille des parties aériennes), de la taille moyenne des nodosités et de la capacité fixatrice d'azote (**Tableau 8**).

Le mutant *vapC4* (*ntrP*) ayant déjà été caractérisé (Bodogai et al., 2006), nous n'avons pas renouvelé son étude. Ce mutant permet, en symbiose avec *M. sativa*, un meilleur rendement végétal que celui obtenu avec la souche sauvage, en accord avec une meilleure capacité fixatrice d'azote.

Les phénotypes obtenus lors de l'interaction de *M. truncatula* avec les 10 autres mutants d'inactivation de toxines VapC de *S. meliloti* varient suivant le système VapBC étudié (**Tableau 8**).

Les mutants d'inactivation *vapC1*, *vapC6*, *vapC8* et *vapC11* ne donnent pas de phénotype symbiotique différent de celui obtenu avec la souche sauvage. En effet, ni la capacité fixatrice d'azote ni le rendement végétal, 6 semaines après inoculation, ne sont significativement différents.

De façon très intéressante, les mutants *vapC9* et *vapC3* ne permettent pas la mise en place de nodosités lors de leur interaction avec *M. truncatula* et présentent un phénotype Nod-. Des analyses plus approfondies devront être réalisées afin de déterminer à quelle étape le processus est interrompu. Nous nous proposons notamment d'introduire dans ces souches mutantes un plasmide répliquatif porteur du gène *lacZ* exprimé de manière constitutive, permettant, en microscopie, une visualisation des bactéries dans les premières étapes de la symbiose et pouvoir ainsi déterminer à quel stade l'infection ou l'organogénèse nodositaire est bloquée.

Les mutants *vapC2* et *vapC7* conduisent à un phénotype de perte de rendement végétal sévère (environ 3 fois), consécutif à une chute importante de la capacité fixatrice d'azote (80%). En raison de ce phénotype inattendu, inverse à ceux précédemment décrits pour les mutants *vapC4* (Bodogai et al., 2006) et *vapC5* (Partie 2 résultats (Lipuma et al., 2014)) lesquels, en interaction avec *M. sativa*, présentent un phénotype symbiotique amélioré

<i>S. meliloti</i>	Gène	Taille des parties aériennes (cm)	Taille moyenne des nodosités (UA)	Capacité fixatrice d'azote en %	Phénotype
WT	-	21,45 (+/-4,5)	1034	100% (+/-1,77)	
vapC1	smc02657	19,03 (+/-4,64)	848	91,2% (+/-3,84)	WT
vapC2	smc01932	7,03	ND	20,28% (+/-2,48)	Fix +/-
vapC3	smc01177	4,34 (+/-0,96)	-	0	Nod -
vapC4	smc01521	-	-	-	<i>M. sativa</i> M. Bodogai et al.
vapC5	smc00687	ND	ND	50,33% (+/-8,37)	Fix+/-
vapC6	smc03137	25,7 (+/-3,2)	ND	92,5% (+/-0,89)	WT
vapC7	smc04881	6,35 (+/-1)	540	12,4% (+/-0,98)	Fix +/-
vapC8	smc00393	18,36 (+/-4,1)	1186	97,1% (+/-1,55)	WT
vapC9	smc00900	ND	-	0	Nod -
vapC10	smc02987	27,625 (+/-2,2)	1322	165% (+/-4,8)	Fix ++
vapC11	smc02715	22,67 (+/-5,07)	838	107% (+/-4,3)	WT

Tableau 8 : Caractéristiques physiologiques et capacité fixatrice d'azote de *Medicago truncatula* en symbiose avec les mutants d'inactivation des toxines VapC de *S. meliloti*

Les plantes de *M. truncatula* nodulées avec les souches mutantes d'inactivation des toxines VapC ont été analysées 6 semaines après infection (6spi). La taille des parties aérienne (cm) et des nodosités (unité arbitraire UA) a été mesurée. La capacité fixatrice d'azote, déterminée par mesure de l'activité réductrice d'acétylène (ARA), est exprimée en pourcentage relatif par rapport à l'activité obtenue avec la souche sauvage.

(Fix++), et du profil d'expression original du gène *vapC7* (expression maximale dans les zones III de la nodosité (**Figure 51**), le mutant *vapC7* a fait l'objet d'une étude approfondie développée en Partie 3 des résultats de cette thèse.

Le mutant *vapC5*, en interaction avec *M. truncatula*, conduit à un phénotype symbiotique altéré (Fix^{+/-}), moins prononcé que ceux des mutants *vapC2* et *vapC7*. Cette toxine VapC5 présentant une similitude importante avec la toxine VapC4 (=NtrP) dont le mutant d'inactivation permet, en interaction avec *M. sativa*, une amélioration du rendement végétal (Bodogai et al., 2006), nous avons également analysé le phénotype obtenu lors de l'interaction avec la plante d'intérêt agronomique *M. sativa* avec ce mutant. Dans le cadre de cette nouvelle interaction, le mutant *vapC5* conduit de façon intéressante à un phénotype d'amélioration du rendement végétal, suggérant ainsi un rôle possible de l'espèce hôte sur les phénotypes obtenus avec les mutants *vapC* (Lipuma et al., 2014). Cet aspect, développé en partie 2 des résultats, sera discuté ultérieurement (Conclusions et perspectives).

Enfin, le mutant *vapC10* conduit à un phénotype d'augmentation du rendement végétal (+20%) avec amélioration de la capacité fixatrice d'azote (augmentation de 50%). Les analyses de la taille et de l'ultrastructure des nodosités obtenues avec ce mutant, montrent que les nodosités présentent une taille légèrement supérieure. Toutefois (**Figure 54**), des analyses plus poussées sont nécessaires pour expliquer ce phénotype Fix⁺⁺ (sénescence retardée, viabilité supérieure des bactéroïdes, ...).

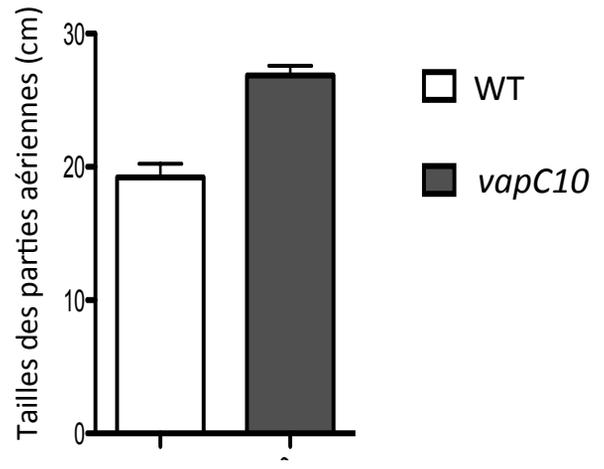
En conclusion de cette partie, l'approche réalisée offre une vision globale du rôle de tous les systèmes de type II d'une même famille (VapBC) chez une bactérie possédant un mode de vie libre et symbiotique. Ce travail original apporte des éléments de réponse quant à la multiplicité et la diversité des systèmes TA sur un génome bactérien. Comme nous l'avions supposé, ces systèmes VapBC semblent assurer des fonctions différentes au cours de l'interaction symbiotique, puisque des phénotypes variés, sont obtenus lors de l'interaction des mutants d'inactivation des toxines avec *M. truncatula*. L'étude du profil d'expression de ces différents systèmes dans la nodosité suggérait également des rôles à des stades différents de l'interaction symbiotique. D'autre part, la divergence, en termes de séquence protéique, des toxines, laisse entrevoir potentiellement une variabilité des cibles visées par ces ARN interférases putatives.

Suite à cette étude globale, nous avons choisi d'approfondir la caractérisation de deux systèmes particuliers : le système *vapBC5*, dont la toxine présente la meilleure homologie

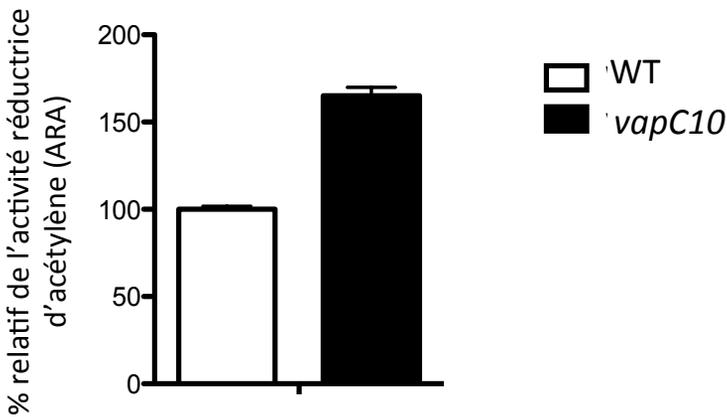
A



B



C



D

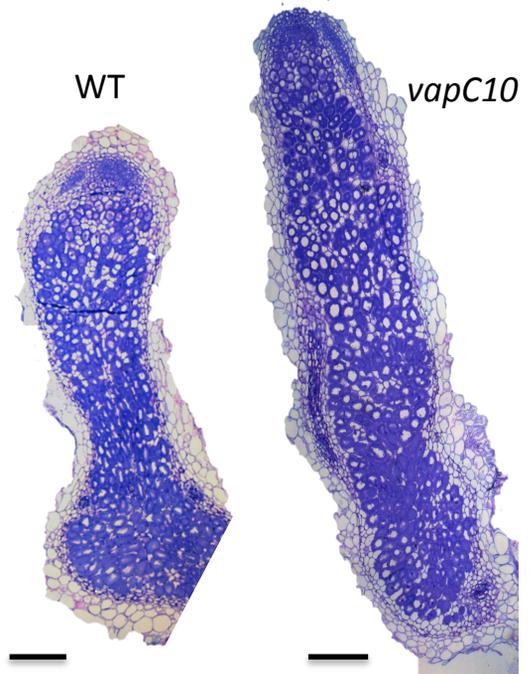


Figure 54 : Caractéristiques physiologiques des plantes et ultrastructure des nodosités de *M. truncatula* induites par le mutant *vapC10* de *S. meliloti*

Les plantes de *M. truncatula* obtenues 6 semaines après inoculation avec la souche mutante *vapC10* sont analysées par (A) la moyenne de la taille des parties aériennes pour 20 plantes (B), la capacité fixatrice d'azote (C) et l'ultrastructure des nodosités. L'ultrastructure est étudiée à partir de coupes ultrafines (5 μm) obtenues après inclusion en résine de tecknovit et coloration au bleu de toluidine (D).

La barre : 50 μm

de séquence avec la toxine VapC4 (=NtrP) précédemment caractérisée (Bodogai et al., 2006) et le système vapBC7 qui se distingue par un profil d'expression nodositaire atypique et un phénotype original et drastique en interaction avec *M. truncatula*.

RESULTATS PARTIE 2 : LE SYSTEME VAPBC5

ACTEUR CLEF DE LA SENESCENCE NODOSITAIRE ET DE L'EFFICACITE SYMBIOTIQUE

Au cours de l'analyse globale présentée ci-avant, concernant le rôle possible des systèmes VapBC de *S. meliloti* dans l'interaction symbiotique, l'analyse des séquences protéiques a permis de mettre en évidence une forte similarité entre les systèmes NtrRP et VapBC5. Ainsi, 24% et 37% de similarités avec NtrP (antitoxine) et NtrR (toxine) sont détectées avec les protéines VapB5 (antitoxine) et VapC5 (toxine), respectivement. (**Figure 43 et 46** Partie 1 des Résultats). Les homologies de séquences protéiques entre NtrPR et toutes les VapBC présentes sur le chromosome de *S. meliloti* sont les plus fortes avec VapBC5. De plus, l'analyse phylogénétique des différentes VapC, suggère que VapC5 et NtrR ont suivi un parcours évolutif similaire à partir d'un ancêtre commun putatif (**Figure 45** Partie 1 des Résultats).

Le module NtrRP est l'unique système TA décrit chez *S. meliloti* et a fait l'objet de plusieurs études (Olah et al., 2001; Puskas et al., 2004; Bodogai et al., 2006). De façon intéressante, il a été démontré qu'un mutant de cette toxine NtrR présente une capacité fixatrice d'azote et un rendement végétal supérieurs au cours de l'interaction symbiotique avec la plante d'intérêt agronomique *Medicago sativa*, en comparaison de la souche WT (Olah et al., 2001).

En fonction de ces données de similarité et du rôle de NtrRP dans la symbiose, nous avons choisi d'étudier la fonction du module VapBC5 en interaction avec *M. sativa*. Cela afin de déterminer si un autre système VapBC, proche d'un point de vue phylogénétique, de NtrRP, pourrait jouer un rôle dans la mise en place du processus de sénescence et influencer le rendement végétal de la légumineuse *M. sativa*.

Toutefois, dans la partie 1 des résultats, reposant sur l'analyse globale des mutants *vapC* en interaction avec *M. truncatula*, nous avons montré que le mutant *vapC5* présentait un phénotype symbiotique altéré (Fix^{+/-}) en comparaison de celui de la souche sauvage. Le fait qu'un mutant *vapC* n'ait pas de phénotype symbiotique en interaction avec *M. truncatula* ne garantit pas qu'il n'en ait pas un en interaction avec *M. sativa*. En effet, on sait que des différences entre ces deux plantes symbiotiques existent. Il a été montré, dans une étude récente que l'interaction symbiotique d'une souche WT de *S. meliloti* avec *M. truncatula* en comparaison avec *M. sativa* présentait une moins bonne capacité fixatrice d'azote

(Sulieman and Schulze, 2010). Des différences au niveau du métabolisme azoté et carboné dans les nodosités ont pu également être mises en évidence (Sulieman and Schulze, 2010). Le phénotype du mutant *ntrR* ayant été décrit chez *Medicago sativa*, plante d'intérêt agronomique, nous avons donc réalisé l'analyse de trois mutants du module VapBC5 (*vapC5*, *vapB5* et Δ *vapBC5*) en interaction avec cette plante.

La caractérisation du module VapBC5 a été réalisée en collaboration avec Iona Dusha et Gabriella Endre du BRC (Biological Research Center) en Hongrie. Pour réaliser cette étude, après validation fonctionnelle du système VapBC en tant que module toxine-antitoxine chez *E. coli*, les phénotypes symbiotiques des trois souches de *S. meliloti* comportant différentes mutations dans l'opéron *vapBC5* ont été étudiés. Les effets de ces mutants sur l'efficacité symbiotique, le rendement végétal et la sénescence nodositaire ont été analysés.

A *vapBC*-type toxin–antitoxin module of *Sinorhizobium meliloti* influences symbiotic efficiency and nodule senescence of *Medicago sativa*

Justine Lipuma,^{1†} Gyöngyi Cinege,^{2‡}
Monica Bodogai,^{2†} Boglárka Oláh,² Aurélie Kiers,¹
Gabriella Endre,² Laurence Dupont¹ and
Ilona Dusha^{2*}

¹Institut Sophia Agrobiotech (ISA), INRA UMR 1355, CNRS UMR 7254, Université de Nice Sophia Antipolis, 400 Route des Chappes – BP167, Sophia Antipolis Cedex F-06903, France.

²Institute of Genetics, Biological Research Center, Hungarian Academy of Sciences, P.O. Box 521, Szeged H-6701, Hungary.

Summary

The symbiotic nitrogen-fixing soil bacterium *Sinorhizobium meliloti* carries a large number of toxin–antitoxin (TA) modules both on the chromosome and megaplasmids. One of them, the *vapBC-5* module that belongs to the type II systems was characterized here. It encodes an active toxin *vapC-5*, and was shown to be controlled negatively by the complex of its own proteins. Different mutants of the *vapBC-5* genes exhibited diverse effects on symbiotic efficiency during interaction with the host plant *Medicago sativa*. The absence of the entire *vapBC-5* region had no influence on nodule formation and nitrogen fixation properties. The strain carrying an insertion in the antitoxin gene showed a reduced nitrogen fixation capacity resulting in a lower plant yield. In contrast, when the toxin gene was mutated, the strain developed more efficient symbiosis with the host plant. The nitrogen fixing root nodules had a delayed senescent phenotype and contained elevated level of plant-derived molecules characteristic of later steps of nodule development. The longer bacteroid viability and abundance of active nitrogen fixing zone resulted in increased production of plant material.

These data indicate that modification of the toxin/antitoxin production may influence bacteroid metabolism and may have an impact on the adaptation to changing environmental conditions.

Introduction

The toxin–antitoxin (TA) modules are ubiquitous constituents of almost all bacterial and archaeal species, located both on their chromosomes and extrachromosomal elements (Pandey and Gerdes, 2005; Leplae *et al.*, 2011). Toxin–antitoxin modules consist of two components, a stable toxin protein and an unstable antitoxin that counteracts its toxin pair, preventing in this way the toxin's harmful effect on cell metabolism. Based on the biochemical nature and mode of action of the antitoxin gene product, TA systems are classified as type I, II, III, IV and V modules. Antitoxins of type I and III systems are ribonucleic acid (RNA) molecules inhibiting the expression (type I) (Gerdes and Wagner, 2007; Fozo *et al.*, 2008) or the activity (type III) (Blower *et al.*, 2012) of toxins. Antitoxins of type II, IV and V systems are proteins that either neutralize their toxin pairs by forming toxin–antitoxin complexes (Gerdes *et al.*, 2005) or inhibit toxin synthesis (Goeders and Van Melderen, 2014). The action of type II TA systems is based on the different stabilities of toxin and antitoxin proteins. When proteases are induced under stress conditions, the unstable antitoxins are degraded faster than the toxins. Free toxins of type II systems exert their effect on various cellular functions acting as initiator transfer RNA (tRNA)-specific, single-stranded RNA- or messenger RNA (mRNA)-specific endoribonucleases, which arrest cell growth by blocking the translation process (Pedersen *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2003; Winther and Gerdes, 2011; Yamaguchi and Inouye, 2011). Antitoxin proteins possess a deoxyribonucleic acid (DNA)-binding motif, and in complex with their toxin partner or alone are capable of auto-repressing the transcription of their own module (Engelberg-Kulka and Glaser, 1999).

Toxin and antitoxin proteins of type II systems are encoded by adjacent, partly overlapping, co-transcribed genes. This structure provides a strict coordination of transcription and translation. Based on the amino acid

Received 19 December, 2013; accepted 18 August, 2014. *For correspondence. E-mail dushai@brc.hu; Tel. 36 62 599 675; Fax 36 62 433 503. †Present address: National Institute on Aging/NIH, Laboratory of Molecular Biology and Immunology, 251 Bayview Blvd., Ste 100, BRC Room 6C705, Baltimore, MD 21224. ‡These two authors had equal contribution to the paper.

sequence homology, nine or 10 toxin families have been described (Pandey and Gerdes, 2005; Syed and Lévesque, 2012). Two families of the type II systems, the *vapBC* and the *relBE*, involve the highest number of modules (Pandey and Gerdes, 2005). The toxin components of *vapBC*-type systems are small proteins of about 130 amino acids homologous to PIN domains, characterized by the presence of three strictly conserved and a fourth less conserved acidic residues required for the catalytic activity (Arcus *et al.*, 2011). PIN domains were identified and designated as the N-terminus of the PiIT protein, and function as endoribonucleases in a sequence dependent manner. Since TA modules are common and in many cases abundant components of genomes, their biological role has been intensively investigated. Apart from the stabilization effect of the plasmid-encoded TA systems, where their role in plasmid maintenance has been documented (Gerdes *et al.*, 1988), the function of chromosomal modules is still controversial (Magnuson, 2007; Tsilibaris *et al.*, 2007; Van Melder, 2010). Toxin–antitoxin modules have been implicated in programmed cell death and stress response (Sat *et al.*, 2001; Hazan *et al.*, 2004), starvation-induced cell stasis (Christensen *et al.*, 2001), biofilm formation (Kim *et al.*, 2009), persistence (Maisonneuve *et al.*, 2011) and quorum sensing (Kolodkin-Gal *et al.*, 2007).

Earlier we described the presence and function of *vapBC*-type TA modules in two soil bacteria, *Sinorhizobium meliloti* and *Bradyrhizobium japonicum* (Oláh *et al.*, 2001; Bodogai *et al.*, 2006; Miclea *et al.*, 2010). Members of the genus *Rhizobiaceae* are able to form symbiotic relationship with their leguminous host plants and reduce atmospheric nitrogen to ammonia in the newly developed plant organs, the root nodules. This highly complex process is coordinated by specific signal exchanges between the partners. Host plants excrete the first signals, flavonoids, which, in conjunction with the bacterial regulator NodD protein, induce the expression of other nodulation genes. The Nod proteins are responsible for the synthesis of bacterial signal molecules, the Nod factors (Dénarié *et al.*, 1996), which elicit the formation of root nodules. Bacteria then invade these organs and differentiate into bacteroids, the nitrogen fixing form of bacteria. In the bacteroids, the enzyme nitrogenase encoded by the bacterial *nif* genes is capable of reducing atmospheric nitrogen (Gibson *et al.*, 2008). The fixed nitrogen can be utilized by the host plant (Jones *et al.*, 2007).

We showed previously that in *S. meliloti*, the mutation of the *ntrR* gene, encoding the toxin component of the *vapBC*-type TA module *ntrPR*, resulted in a pleiotropic effect on the symbiotic properties with the host *Medicago sativa*. The *ntrR* mutant strain elicited nodules more efficiently than the wild-type strain even in the presence of

exogenous nitrogen source (Dusha *et al.*, 1989). Moreover, due to the enhanced nitrogen fixation capacity of bacteroids, the host plants had increased dry weight and nitrogen content (Oláh *et al.*, 2001). A comparative genomic analysis demonstrated that 42% of all identified TA loci belong to the *vapBC* class (Makarova *et al.*, 2009). When the chromosome of *S. meliloti* was searched for TA loci using sequence alignments, 12 TA modules were identified, seven of them belonging to the *vapBC* family (Pandey and Gerdes, 2005). An automated screening method, the RASTA-Bacteria program extended the search to the complete genome of *S. meliloti* including the two megaplasmids (Sevin and Barloy-Hubler, 2007). By this method, 25 putative TA loci, among them 11 *vapBC*-type modules (Shao *et al.*, 2011), were found on the chromosome, and 28 further modules were localized on the two megaplasmids.

Considering the relatively high number of predicted TA modules in *S. meliloti* and the prevalent *vapBC*-type systems among them, an interesting question was, what could be the importance, if any, of these genome components in bacterial metabolism. Furthermore, previous data obtained with the *ntrPR* module suggested that the symbiotic interaction with the host plant could also be affected by the mutation of such systems (Dusha *et al.*, 1989; Oláh *et al.*, 2001). In this work, we investigated the properties of an additional *vapBC* module and characterized it as a TA locus. By creating different types of mutations, the effects on symbiotic interaction with the host plant *M. sativa* were examined.

Results

vapBC-5 identified as the best homolog of the ntrPR operon

By using the RASTA-Bacteria program, 11 chromosomal *vapBC*-type TA systems were identified in the symbiotic nitrogen-fixing bacterium *S. meliloti* (Sevin and Barloy-Hubler, 2007). The *ntrPR* module of one of these systems was identified and characterized earlier (Oláh *et al.*, 2001; Bodogai *et al.*, 2006). We examined whether any of the other modules may exhibit homology to the *ntrPR* system. Among the putative proteins determined by the 10 other *vapBC*-type systems, the highest identity at the amino acid level (24% and 37% with NtrP and NtrR respectively) was found to VapBC-5 (Fig. 1), described and designated earlier by Pandey and Gerdes (2005). The *vapBC-5* module consists of the genes SMc00686 and SMc00687, which encode a putative antitoxin protein of 77 amino acids and a putative toxin of 132 amino acids respectively. The two genes form an operon located on the reverse strand of the chromosome and show an overlap of one nucleotide. The N-terminal regions of NtrP and VapB-5 antitoxins show higher homology than their

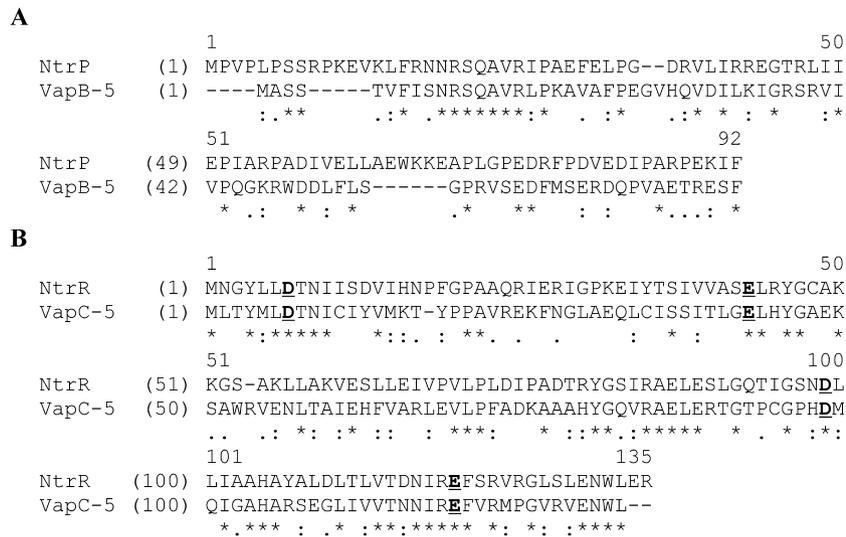


Fig. 1. Homology of the deduced amino acid sequences of antitoxins NtrP and VapB-5 (A) and toxins NtrR and VapC-5 (B). Conserved amino acids characteristic for the PIN domain are shown as underlined bold letters in the toxins. Identical amino acids are labelled with asterisks.

C-terminal parts (Fig. 1). The NtrR and VapC-5 are PIN domain-containing toxins characterized by the presence of four invariable acidic residues and a less conserved general amino acid sequence.

Toxicity of VapC-5

To demonstrate that the *vapBC-5* operon represents a functional TA module, the genes encoding the antitoxin and toxin were cloned in the plasmid pBAD24 (Guzman *et al.*, 1995) under the control of an arabinose-inducible promoter.

When *Escherichia coli* cells carrying the antitoxin gene in the plasmid pRB119 were induced, the viability of the host cells remained identical to the control cells carrying the pBAD24 vector plasmid (Fig. 2). However, when the expression of the toxin was induced using the plasmid pRB114, the number of viable cells decreased by about two orders of magnitude. The toxic effect of VapC-5 was neutralized by the simultaneous expression of the VapB-5 antitoxin; therefore, the expression of both proteins from plasmid pRB121 had no effect on cell viability. These data demonstrated that the chromosomal *vapBC-5* module represents a functional type II TA system.

Autoregulation of the *vapBC-5* operon

Transcription of type II TA modules is generally characterized by negative autoregulation (Makarova *et al.*, 2009). A complex formed by the toxin and antitoxin proteins is able to bind to a repeat sequence in the promoter region and block the transcription of the operon. To study the possible role of VapB-5 and VapC-5 proteins in the transcriptional control of the operon, the plasmid pRB96 was constructed, which carried the *vapBC-5* promoter fused to a

promoterless *lacZ* gene on the vector pEP82 (Éló *et al.*, 1998). This construct was introduced by conjugation into wild-type *S. meliloti* and into three different *vapBC-5* mutants. Two mutant strains, GC140 and BM210 were created in this work in *S. meliloti* 1021 genetic background. The strain GC140 carried complete deletion of the *vapBC-5* region, whereas in BM210, a gentamicin resistance gene was inserted into the antitoxin-encoding *vapB-5* gene (Fig. 3). The third mutant strain, UNA405, in which the toxin gene *vapC-5* is affected by the insertion of

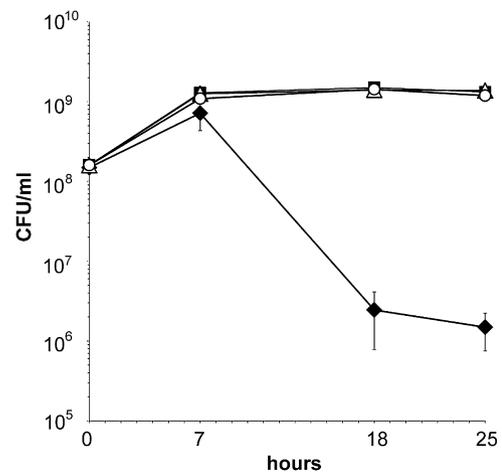


Fig. 2. Toxicity of the VapC-5 protein in *E. coli* DH5 α . Expression of the VapB-5 antitoxin from plasmid pRB119 (black squares), expression of VapC-5 toxin from plasmid pRB114 (black diamonds) and the simultaneous expression of VapB-5 and VapC-5 from plasmid pRB121 (white triangles) were induced by the addition of 1% arabinose to *E. coli* cultures at OD₆₀₀ = 0.4. Control cells carried the vector plasmid pBAD24 (white circles). Samples taken at 0 h, 7 h, 18 h and 25 h after induction were diluted and plated on LB medium containing 100 μ g ml⁻¹ ampicillin. Living cell numbers were calculated from data of four independent experiments. Bars represent standard deviations.

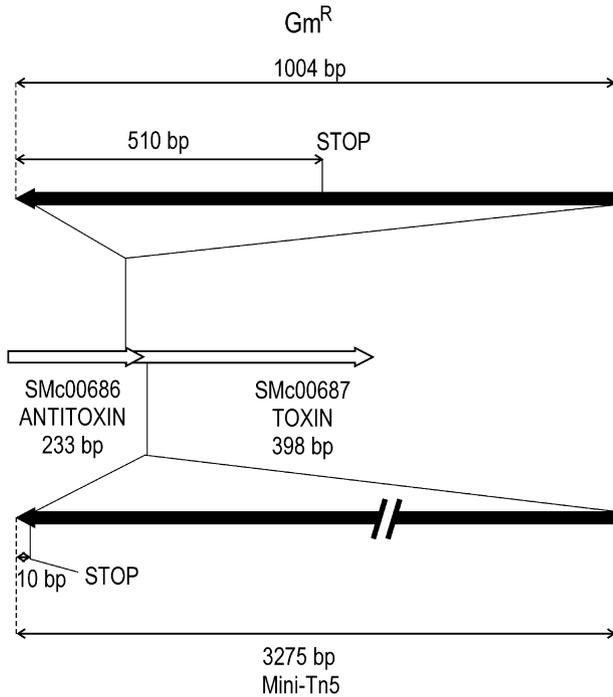


Fig. 3. Construction of insertion mutant strains BM210 and UNA405. The partially overlapping *vapB-5* antitoxin and *vapC-5* toxin genes are represented by white arrows. Above the genomic region the construction of strain BM210 is shown. The 1004 bp Gm^R gene was inserted near to the 3' end of the antitoxin gene in reverse orientation (black arrow). Below the genomic region the insertion site of the 3275 bp mini-Tn5 (also in reverse orientation) in the toxin gene is shown by a black arrow. STOP: demonstrates potential in frame translational stop codons newly created by the insertions.

a mini-Tn5, was earlier constructed in *S. meliloti* 2011 background by Pobigajlo and colleagues (2006) (Fig. 3). β -Galactosidase measurements were carried out to test the activity of the *vapBC-5* promoter. Both in the deletion and insertion mutant strains (GC140 and BM210 respectively), 6–7 times higher activity was detected as compared with that in the wild-type strain (Fig. 4A). In the *vapC-5* mutant strain UNA405, the promoter activity was threefold higher than in the corresponding wild-type strain *S. meliloti* 2011 (Fig. 4B). These results demonstrated that the *vapBC-5* operon is under the negative control of the complex formed by its own proteins.

Characterization of the *vapBC-5* mutant strains

The strain UNA405 was obtained from the mini-Tn5 library of *S. meliloti* mutants (Pobigajlo *et al.*, 2006). The 3275 bp sequence of the mini-Tn5 insertion was localized in reverse orientation at the 5' end of the *vapC-5* gene, between nucleotides 10 and 11, resulting in a truncated protein of six amino acid residues only, while the antitoxin integrity was not affected (Fig. 3).

In the mutant strain BM210, a 1004 bp fragment carrying the gentamicin resistance gene was inserted in reverse orientation at the 66th codon of *vapB-5* (Fig. 3). To examine the effect of the insertion, first the possible transcription of the toxin and modified antitoxin genes was checked. Since the gentamicin cassette was inserted in *vapB-5* at the 201st bp, the last 35 nucleotides were cut from the 3' end of the gene during transcription. Due to the inverse orientation of the Gm^R gene, the translation of the antitoxin may continue until the 510th nucleotide in the Gm^R gene.

To test the presence of *vapB-5* and *vapC-5* transcripts, mRNA was isolated from the wild-type strain and from the BM210 insertion and GC140 deletion derivatives. Complementary DNA (cDNA) was synthesized, and reverse transcription polymerase chain reactions (RT-PCR) were performed. To check the transcription of antitoxin, the primers RT-AT-1 and RT-AT-2 (Table S1) were used to amplify a 149 bp fragment localized near to the 5' end of the *vapB-5* gene. The transcription of the toxin was

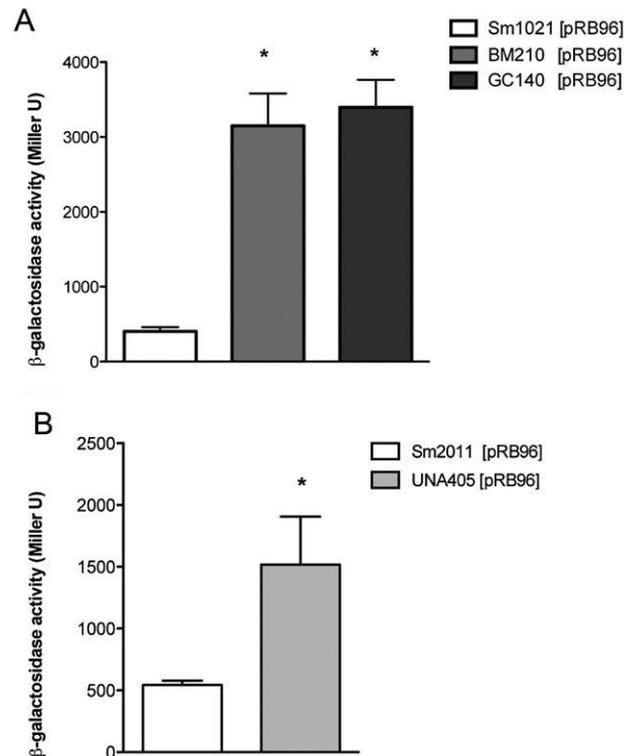


Fig. 4. The *vapBC-5* operon is autoregulated by the complex of VapB-5 and VapC-5 proteins. β -Galactosidase activity expressed under the control of the *vapB-5* promoter from plasmid pRB96 was determined in wild-type strains and their mutants. A. *Sinorhizobium meliloti* 1021, BM210 and GC140. B. *Sinorhizobium meliloti* 2011 and UNA405. Samples from growing bacterium cultures were taken at OD_{600} 0.6–0.7, and enzyme activities calculated as Miller units with standard deviation were measured from parallel samples in four to six independent experiments.

examined by using the primers RT-T-1 and RT-T-2 (Table S1) to amplify a 125 bp fragment located 68 bp downstream of its start codon. The *vapB-5* and *vapC-5* transcripts were present both in the wild-type strain and in the insertion mutant BM210, and, as expected, they were absent in the strain GC140 where the *vapBC-5* region was completely deleted (Fig. S1).

In further experiments, we wanted to clarify whether potential protein products in the BM210 strain were able to form a complex, and whether this complex was able to bind to the promoter region. The results of autoregulation experiments excluded the second possibility, since the negative autoregulation of the module was absent in strain BM210 (Fig. 4A), suggesting that the promoter was not blocked by the AT complex (or by the antitoxin).

To determine whether, despite the chimeric (or truncated) nature of the antitoxin, it could still impair the toxic effect of VapC-5, a fragment covering the complete module from BM210 (antitoxin with Gm^R insertion and toxin) was amplified using the AT1antit1 and AT1t2 primers (Table S1) and cloned in the vector pBAD24. *Escherichia coli* cells carrying this plasmid pID1041 were tested for viability after arabinose induction. Since this construct was not toxic (data not shown), we concluded that either the modified antitoxin was still able to neutralize the toxic effect of VapC-5 by complex formation, or a complex was not formed, but the free toxin was not functional. To exclude this possibility, the *vapC-5* gene was amplified from pID1041 by the primers AT1t1 and AT1t2 (Table S1) and cloned in the pBAD24 vector, resulting plasmid pID1042. The insert was sequenced and proved to be identical with the wild-type *vapC-5* gene. When introduced into *E. coli* cells, the viability test demonstrated that the toxin was fully active (data not shown).

We concluded that the modified antitoxin was able to bind the toxin, since the mutant module on pID1041 had no toxic effect on *E. coli*, and the toxin alone was still active. The absence of autoregulation in BM210, however, suggested that the promoter was not repressed by complex binding. Finally, the possibility that these results might be due to the lack of synthesized VapB-5 and VapC-5 proteins was excluded in experiments where the symbiotic properties of BM210 were compared with those of the wild-type and GC140 strains (see below).

Nodulation kinetics of the *vapBC-5* mutant strains

To examine if the mutations in the *vapBC-5* operon have an effect on the nodulation capacity of bacteria in the interaction with their host plant, *M. sativa* plants were infected with the *vapBC-5* mutant derivatives and the wild-type strains. The number of nodules developed on plant roots were counted during a 7–8-week period. The nodulation kinetics of the deletion derivative GC140 and the wild-type strain *S. meliloti* 1021 were identical (Fig. 5A), as well as the *vapC-5* mutant UNA405 and its wild-type strain *S. meliloti* 2011 (Fig. 5B). In contrast, alfalfa plants inoculated with the insertion mutant BM210 produced higher number of nodules after the third week (Fig. 5C). By the end of the test period, these plants developed about twice as many nodules as the wild-type strain.

To investigate the molecular background of the nodulation phenotype of the strain BM210, the expression levels of *nodD1* and *nodABC* genes were determined. NodD1 protein is constitutively expressed in wild-type *S. meliloti*, and after interacting with the plant-exuded flavonoid signals, NodD1 acts as transcriptional activator of other *nod* genes (Mulligan and Long, 1985; Peck *et al.*, 2006). The *nodABC* genes encode for proteins responsible for

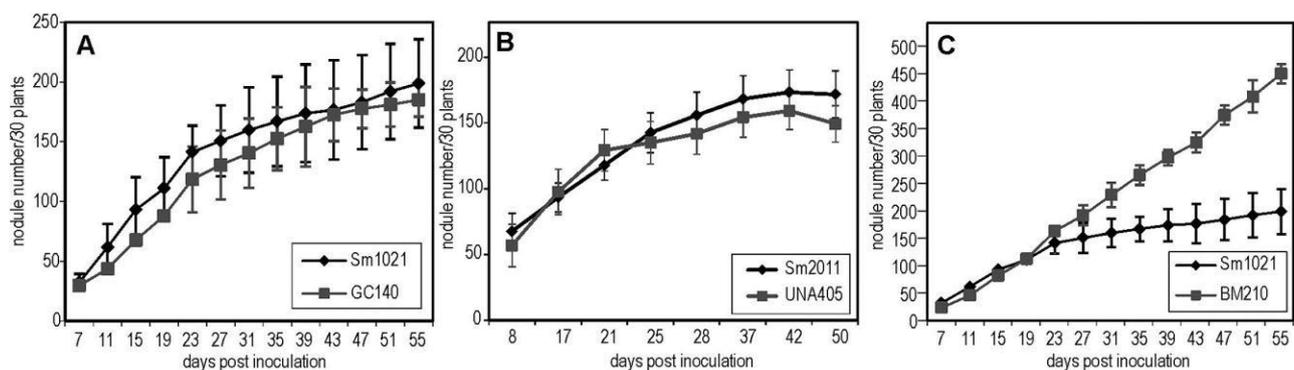


Fig. 5. Nodulation kinetics of wild-type and mutant *S. meliloti* strains on the host plant *M. sativa*. Inoculation was performed by the freshly grown and washed bacterial cultures of the indicated *S. meliloti* strains. Black diamonds correspond to *S. meliloti* wild-type strains, grey squares represent strain GC140 in A, strain UNA405 in B and strain BM210 in C. Nodules on the plant roots were counted on the indicated days. Total nodule number on plants was calculated from three independent plant tests, each including 30 plant individuals for each bacterium strain.

the synthesis of the Nod factors, the bacterial signal molecules which elicit root nodule formation (Schultze *et al.*, 1994). The *nodABC* genes can be induced by adding the main inducer, luteolin to the free-living bacterial cultures. Promoter activities of *nodD1* and *nodABC* genes were measured by using promoter-*lacZ* reporter gene fusions. The plasmids pRmM61 and pRmM57 carrying the *nodD1-lacZ* and *nodABC-lacZ* fusions, respectively, were introduced by conjugation into the mutant BM210 and into the wild-type and GC140 strains as controls. The β -galactosidase activity of *nodD1-lacZ* fusion in wild-type and mutant strains was at similarly high level (Fig. S2). The activity of *nodABC-lacZ* fusion in luteolin-induced cells was lower both in GC140 and BM210 strains as compared with that of the wild-type cells. These data did not explain the higher nodule number obtained with the mutant strain BM210. In addition, the lower level of *nodABC* expression in GC140 contradicted the result that this strain induced normal nodulation. Therefore, in further experiments the effect of mutations of the *vapBC-5* module on nitrogen fixation efficiency was examined (see below).

Structure of the nitrogen-fixing root nodules

To investigate the effect of different *vapBC-5* mutations on the integrity of the symbiotic organs, the structure of the wild-type and mutant nodules was analysed. Although the number of nodules elicited by the *vapC-5* mutant strain UNA405 was identical with that of the wild-type *S. meliloti* 2011 strain, the size and structure of the mutant nodules suggested an enhanced nitrogen fixing capacity (Fig. 6A). The mutant root nodules were 50% larger, as it was statistically confirmed by measuring the whole nodule surfaces (data not shown). The structural analysis of stained longitudinal sections of wild-type nodules (Fig. 6Aa) exhibited the typical zones of mature 6-week-old nodules: meristematic zone I, infection zone II, where invading bacteria were released into host plant cells, nitrogen fixation zone III, where the elongated and differentiated bacteroids converted dinitrogen to ammonia and the senescent zone IV (Vasse *et al.*, 1990). In contrast, the nitrogen-fixing zone was particularly long in the *vapC-5* mutant nodules (Fig. 6Ad) due not only to the increased length of nodules but also to the lack of a typical senescent zone IV. The senescent structures in the wild-type nodules were associated with bacteroid degradation and the loss of cell membrane integrity (Fig. 6Ac). In contrast, the cells at the basal part of the toxin mutant nodules were still full of bacteroids without any sign of senescence (Fig. 6Af), suggesting a higher number of infected cells and a possibly enhanced viability of bacteroids as well. These characteristics of the nodule structure implied an improved nitrogen fixation (Fix⁺⁺) phenotype of the VapC-5

toxin-deficient nodules, and were further confirmed in experiments by analyzing the nitrogen fixation capacity and plant yield (see below).

The structure of the root nodules induced by the insertion mutant BM210 also showed remarkable differences as compared with the wild-type strain Sm1021 (Fig. 6B). The 6-week-old nodules on BM210-infected alfalfa plants displayed abnormal small size and spherical morphology. When longitudinal sections were examined by light microscopy, well-formed zones characteristic of wild-type nodules could be identified on plants infected by Sm1021 (Fig. 6Ba). In contrast, in the nodules induced by BM210 mutant, the cells of the nitrogen-fixing zone III were compressed into a smaller compact region (Fig. 6Bc). In this zone, invading bacteria were released in the plant cytosol (Fig. 6Bd), and some bacteroid differentiation was also observed. However, these bacteroids were smaller by about 40% as compared with the wild-type bacteroids (Fig. S3). The number of infected cells and their bacteroid content were also lower in the mutant nodules, suggesting that these nodules were functionally less active or even defective.

Symbiotic efficiency of the mutant strains BM210 and GC140

The reduction of dinitrogen to ammonia is catalysed by the enzyme complex nitrogenase encoded by the *nifHDK* genes. The *fix* genes determine proteins required for the function of nitrogenase. The *nif* and *fix* genes are transcribed under the control of the regulatory genes *nifA* and *fixK* (Fischer, 1994; Jones *et al.*, 2007). To test the possible effects of *vapBC-5* on nitrogen fixation efficiency, the expression level of *nifH* and *fixK* genes was investigated in root nodules by using promoter-*lacZ* fusions. The plasmids pMB210 and pJJ5 carrying *nifH-lacZ* and *fixK-lacZ* fusions, respectively, were conjugally introduced into wild-type and mutant bacteria, which were used to inoculate *M. sativa* plants, and β -galactosidase activities were measured from root nodules at two different time points after inoculation. The expression of the *nifH-lacZ* construct was lower in nodules elicited by BM210 than in the wild-type nodules already after 18 days post-inoculation, and this level drastically decreased by the 52nd day (Fig. 7A and B). The *nifH-lacZ* expression in the nodules induced by the strain GC140 was similar to or identical with that of the wild-type nodules (Fig. 7A and B). Interestingly, the β -galactosidase activity of the *fixK-lacZ* fusion did not show remarkable changes in nodules induced by the mutant strains, except for a slight decrease in BM210-induced nodules at the end of the growth period (Fig. 7C and D).

These data confirmed that the impaired nodule structure is coupled with continuously decreasing nitrogen

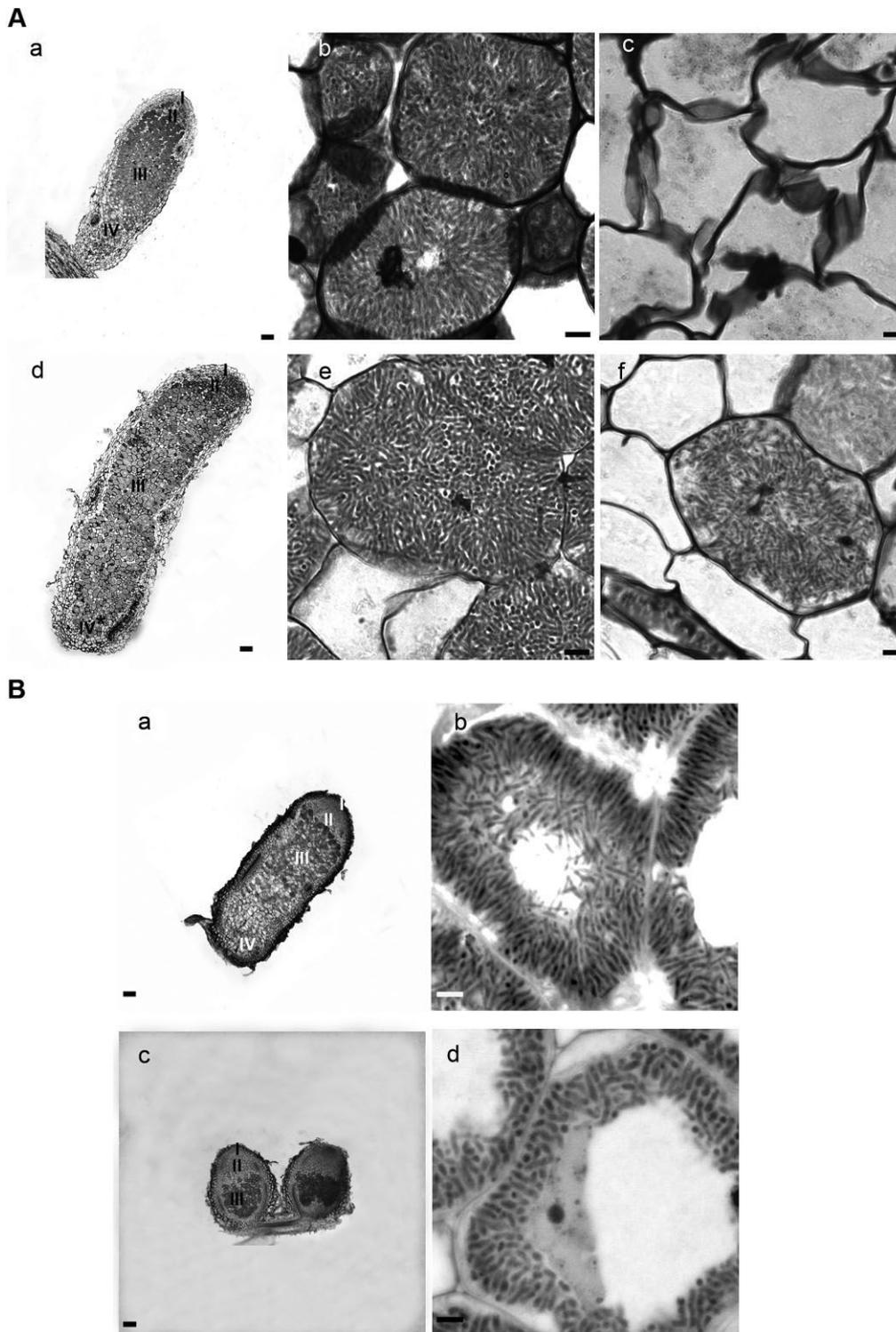


Fig. 6. Comparison of the nodule structures of *M. sativa* elicited by wild-type and mutant *S. meliloti* strains. A. Nodules induced by *S. meliloti* 2011 (a, b, c) and UNA405 mutant (d, e, f) strains. Developmental zones are indicated in the longitudinal nodule sections (a, d) as follows: I: meristematic zone, II: infection zone, III: nitrogen-fixing zone, IV: senescent zone, IV*: altered senescent zone. Infected cells of the fixation zone III are shown in b and e. Cells of the senescent zone IV of Sm2011-induced nodules, or from the basal part of the UNA405-induced nodules (zone IV*) are shown in c and f respectively. Bars in the images: 100 μ m (a, d) and 5 μ m (b, c, e, f).

B. Nodules induced by *S. meliloti* 1021 (a, b) and BM210 mutant (c, d) strains. Developmental zones in the longitudinal sections (a, c) are labelled as in panel A. Infected cells of the fixation zone III are shown in b and d. Bars in the images: 100 μ m (a, c) and 5 μ m (b, d).

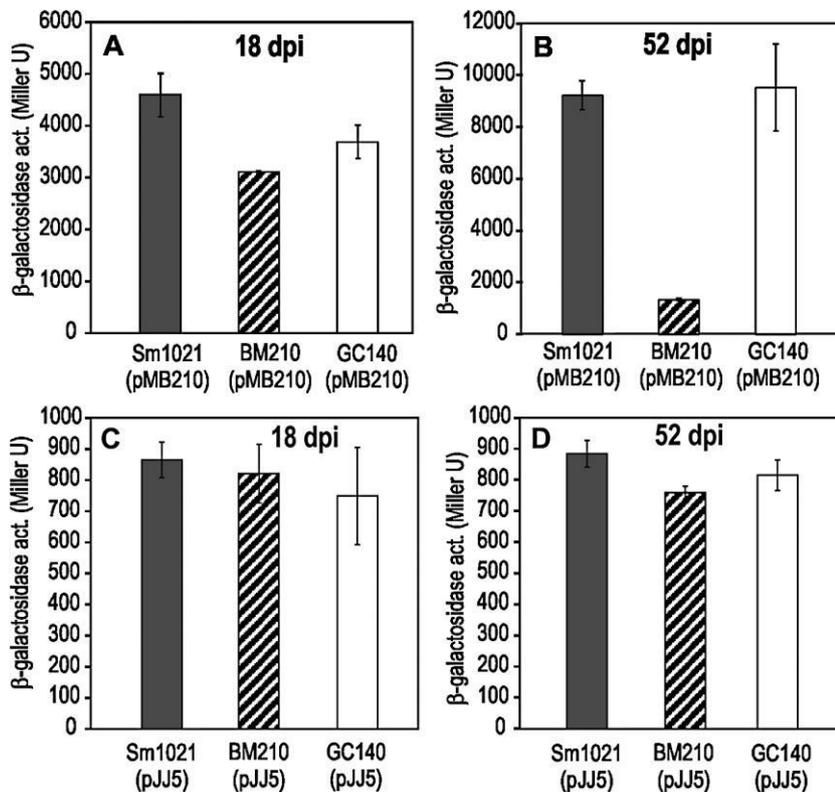


Fig. 7. Promoter activities of nitrogen fixation genes *nifH* and *fixK* in nodules of alfalfa plants inoculated with wild-type and mutant *S. meliloti* strains. Bacterium strains used for the inoculation of *M. sativa* carried the plasmid pMB210 (*nifH-lacZ*) (A and B) or the plasmid JJ5 (*fixK-lacZ*) (C and D). For each measurement 20–30 mg 18 or 52-day old nodules were collected, crushed and centrifuged. Enzyme activities and protein concentrations were determined from the supernatants. Activities calculated as Miller units were determined from two independent plant tests, and were calculated as $1000 \times OD_{420}/\text{min} \times \text{mg} \times \text{ml}$. dpi: days post-inoculation.

fixation efficiency due to the inefficient nitrogenase expression in the nodules formed by the mutant BM210. This resulted in an insufficient nitrogen supply of host plants, which triggered the initiation of new nodules on roots. It should be emphasized that the lack of the entire *vapBC-5* TA module in strain GC140 did not cause any detectable change in symbiosis.

The differences of nitrogen fixation efficiency affected the plant dry matter yield of *M. sativa* inoculated by the wild-type and the mutant strain BM210. Alfalfa plants were harvested at the end of a 2-month growth period, the shoots were collected, dried and their weight measured. The dry weight of the plants inoculated with the BM210 strain was significantly lower than that of the wild-type or the GC140 mutant strains (Fig. 8). These data further confirmed that the complete absence of the *vapBC-5* module had no influence on symbiotic efficiency, but the mutation in the antitoxin gene resulted in a remarkable defect. This also suggests protein production from the mutant *vapBC-5* operon in BM210, since the symbiotic characteristics of this mutant differ from those of GC140 where the whole module was deleted.

Symbiotic phenotype of the *vapC-5* mutant strain UNA405

The nitrogen-fixing capacity and plant yield of the wild-type (Sm2011) and toxin-deficient (UNA405) strains were

also examined 6 weeks after inoculation of *M. sativa*. The nitrogen fixation efficiency measured by the acetylene reduction capacity of root nodules showed that the *vapC-5* mutant strain was 60% more efficient than the wild-type strain (Fig. 9A). The Fix^{++} phenotype of the strain UNA405 that was suggested by its enlarged nodule structure was further supported by an increased plant yield. The improved nitrogen-fixing ability resulted in an average

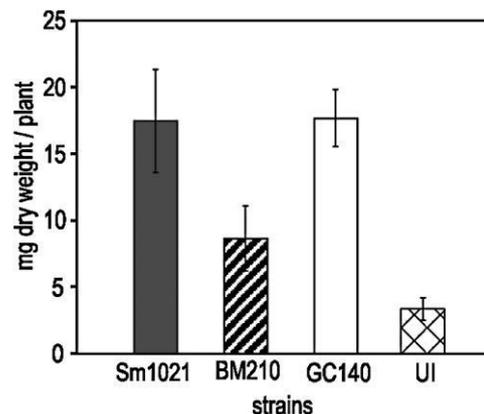


Fig. 8. Dry matter yield of alfalfa plants inoculated with the wild-type, insertion and deletion mutant (BM210 and GC140) *S. meliloti* strains. Two-month old plants were harvested, and shoots were cut and dried. Plant weight was determined from three independent plant tests, each containing 30 parallel plants for each inoculant strain. UI: uninoculated control plants.

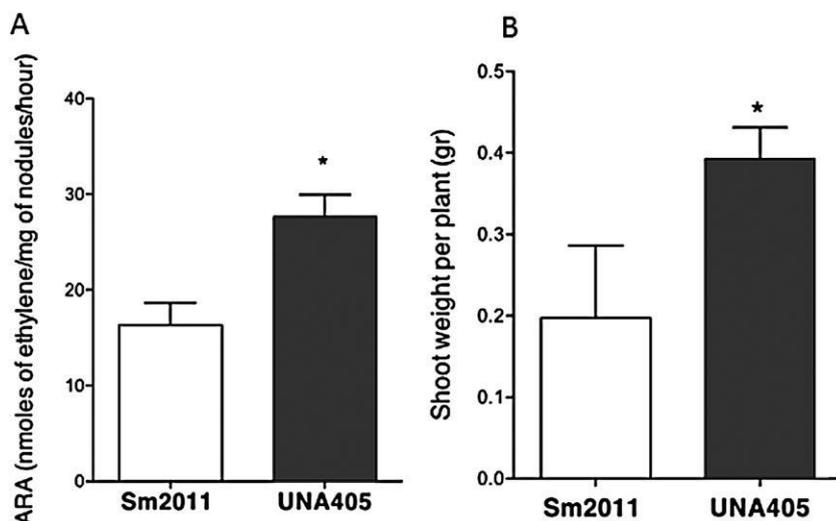


Fig. 9. A. Nitrogen fixation efficiency of the wild-type *S. meliloti* 2011 (empty column) and the *vapC-5* mutant UNA405 (black column) strains determined by acetylene reduction assay according to Hérouart and colleagues (1996).

B. Plant yield of *M. sativa* inoculated by the indicated strains. Shoot dry weight was measured 6 weeks post-inoculation. Plant nodules and shoots of three independent plant tests each including 30 plant individuals were used for measurements.

weight of shoots twice as large as that obtained with the wild-type strain (Fig. 9B), and the average shoot length was also 60% higher (data not shown). Since the number of nodules obtained by the two strains was identical (Fig. 5B), the enhanced symbiotic performance of UNA405 was due to the enhanced nitrogen fixation capacity of the nodules.

Structural analysis of nodules elicited by the strain UNA405 suggested the presence of a higher number of infected cells and a reduced or absent senescent zone in nodules. To confirm this observation by a molecular approach, the expression of plant gene markers NCR001 (Mergaert *et al.*, 2003) and leghaemoglobin, known to be specific for the nitrogen-fixing zone III and absent in the senescent zone IV, was analysed in nodules induced by the wild-type Sm2011 and mutant UNA405 strains.

To decrease the dilution of RNAs originating from different nodule zones, a crude enrichment of the nitrogen-fixing and senescent zones was performed, as described by Van de Velde and colleagues (2006). The 6-week-old nodules were split into two equal halves (Fig. 10A) corresponding to the apical (A) and basal (B) parts of the

nodule. Total RNA was then extracted from both samples and used for quantitative RT-PCR (RT-qPCR) experiments (Fig. 10B). As expected, strong reduction of the relative expression of NCR001 and leghaemoglobin genes was observed in the basal part (enriched in senescent cells) of the wild-type nodules as compared with the apical part (enriched in nitrogen fixing cells). In contrast, no significant decrease in the relative expression of NCR001 and Lb genes was found between the apical and basal parts of the nodules induced by the strain UNA405, suggesting the presence of an active nitrogen fixation also in the older part of the nodules. These results confirmed that the absence of a visible senescent zone in *vapC-5* mutant nodules was associated with an enhanced and prolonged activity of the functional nitrogen fixation zone.

Discussion

In this work, we aimed to functionally characterize the chromosomally located *vapBC-5* TA system of the nitrogen-fixing soil bacterium *S. meliloti*, and to explore its

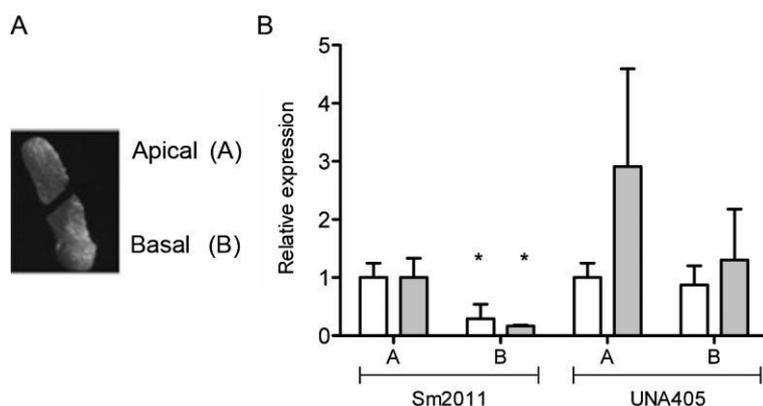


Fig. 10. Expression of plant gene markers NCR001 and leghaemoglobin (Lb) determined from nodules of *M. sativa* inoculated with the wild-type *S. meliloti* 2011 and the *vapC-5* mutant UNA405 strains.

A. The nodules were cut into two halves: apical (A) and basal part (B) as indicated. B. The expression of NCR001 (white) and Lb (grey) was determined by RT-qPCR using the RNA isolated separately from A and B parts of the nodules. Each reaction was performed in triplicate, the results are the means of three independent experiments ($P < 0.05$).

potential involvement in the symbiotic interaction with the host plant *M. sativa*. The genome of *S. meliloti* carries a high number of TA modules, and the *vapBC*-type systems belonging to the type II TA family are overrepresented among them (Sevin and Barloy-Hubler, 2007).

The high prevalence of type II TA systems in free-living bacteria suggested that these modules may contribute to the adaptation to environmental stress (Gerdes *et al.*, 2005; Ramage *et al.*, 2009; Syed and Lévesque, 2012). Symbiotic nitrogen-fixing bacteria may represent a special case to study the role of TA modules. In their free-living form, these bacteria encounter various stress conditions in the soil: variable temperature, occasional lack of nutrients, draught, etc. When symbiotic relationship is formed with the eukaryotic partner, bacteria undergo terminal differentiation within the plant cell, and their metabolism is adapted to the dramatically changed conditions, such as microoxic environment, dependence of plant carbon supply, etc. Therefore, the investigation of the potential involvement of the high number of TA modules in the adaptation to different lifestyles may provide further information on the role of TA systems in bacterial life.

Previous data on the *ntrPR* system demonstrated that a mutation in the toxin gene resulted in improved symbiotic performance (Oláh *et al.*, 2001). Furthermore, a comparison of gene expression of wild-type and *ntrR* mutant bacteria revealed a wide-range modulating effect of *ntrR* mutation under microaerobiosis (Puskás *et al.*, 2004). In this work, we analysed another *vapBC*-type TA module, the chromosomal *vapBC-5* system, which encodes proteins homologous to the NtrPR proteins (Fig. 1). The VapB-5 antitoxin represents an AbrB domain (Strauch *et al.*, 1989), and the VapC-5 toxin is a PIN-domain homologue (Makarova *et al.*, 1999; Wall and Kaiser, 1999; Arcus *et al.*, 2011), as was also described for the NtrPR proteins (Bodogai *et al.*, 2006). The VapC-5 toxin is functionally active. By expressing VapC-5 under the control of the arabinose promoter in *E. coli*, the viability of bacteria decreased by two orders of magnitude in 18 hours. The toxic effect was neutralized by the simultaneous expression of the VapB-5 antitoxin (Fig. 2). The structural organization and regulation of the operon also corresponded to the characteristics of a type II TA module. The promoter of the *vapBC* operon was under the negative control of the TA complex (Fig. 4). Earlier, we demonstrated the role of a direct repeat sequence in the promoter of the *ntrPR* operon 5'-TTCGGCATATACATTTAGGCATATACAAAGGAGACGAATGCCATG-3' in the binding of the NtrPR complex (Bodogai *et al.*, 2006). A similar direct repeat sequence was found in the promoter region of the *vapBC-5* module: 5'-CTACGTATATCCCACTCGTATATGCAAAAAGGAATGGACCTTG-3'. Since the *vapBC-5* module was not repressed by the NtrPR complex either in

GC140, in BM210 or in UNA405 strains, these data suggest that the protein components of the two modules were not able to influence each other's transcription.

In order to investigate the possible effect of *vapBC-5* on the symbiotic properties of *S. meliloti*, three different mutations of the module were created. The elimination of the complete module had no effect either on the nodule forming ability or on the symbiotic efficiency with the host plant (Figs 5, 7 and 8). Similar results regarding the complete deletion of a module were also described for other TA systems. In *Mycobacterium smegmatis*, no phenotype was found when individual TA systems were deleted, but after removal of three different modules (*vapBC*, *phd/doc*, *mazEF*), a survival defect was observed due to the disruption of catabolic and anabolic reactions (Frampton *et al.*, 2012). While deletions of several TA loci had no detectable effect on persister cell formation, the successive removal of 10 type II TA modules gradually reduced the persister level in *E. coli* (Maisonneuve *et al.*, 2011). These results suggested that TA loci are redundant; the individual modules form a network participating in the common functions of the cell. Considering the relatively high number of TA modules, a similar network may also function in *S. meliloti*, but examination of further modules is required to demonstrate a possible cooperation of rhizobial TA systems.

Mutations in the antitoxin or in the toxin genes resulted in opposite symbiotic phenotypes: bacteria carrying a mutant toxin gene (strain UNA405) developed more efficient nitrogen-fixing interaction with *M. sativa*, whereas the strain with a mutant antitoxin gene (strain BM210) had a reduced nitrogen-fixing activity. In the latter case, a higher number of root nodules developed during the growth period (Fig. 5; Fig. S2) indicating that, due to the inefficient nitrogen fixation, the host plant was starved for nitrogen, thus initiation of additional nodules was permitted on plant roots.

The phenotypes of this antitoxin *vapB::Gm^RC-5* insertion mutant can be explained as a result of the disruption of toxin–antitoxin balance in the cells. The production of either a truncated or a fusion antitoxin protein may affect some of the functions of the mutant *vapBC-5* module in the strain BM210. We observed that (i) the complex-forming ability of the modified antitoxin with the toxin can be retained, since the expression of the whole module with the insertion is not toxic in *E. coli*, (ii) however, such a complex is not active in repressing the transcription of the *vapB::Gm^RC-5* module (Fig. 4), and (iii) the toxic activity of VapC-5 is intact. Therefore, we suppose that either the accumulation of incorrect proteins or their degradation products, or the accumulation of the more stable toxin could be responsible for the reduced symbiotic activity of the mutant strain BM210. The molecular mechanism and specificity of VapC-5 are not yet known, but on the basis

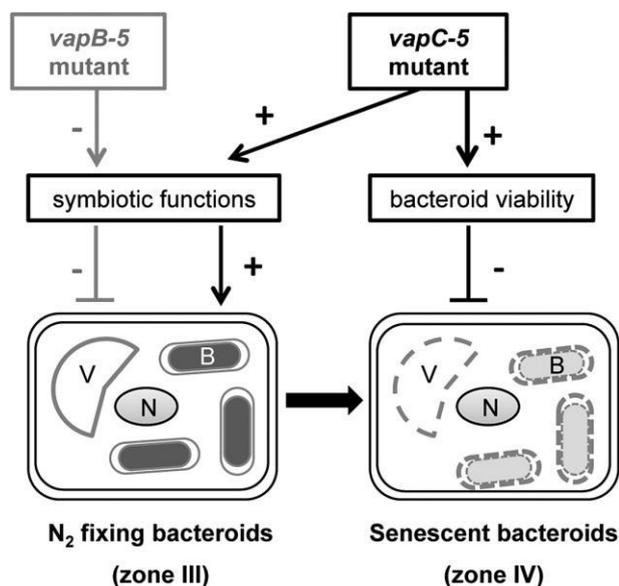


Fig. 11. Schematic model summarizing the influence of the different *vapBC-5* mutations of *S. meliloti* strains on their symbiotic interaction with *M. sativa*. Infected cells of the host plant from the nitrogen fixation zone III and from the senescent zone IV of root nodules are shown. V: vacuole, N: nucleus, B: bacteroid. The impact of the *vapB-5* and *vapC-5* mutations is demonstrated with grey and black lines respectively. The dotted lines indicate the loss of membrane integrity and degradation.

of its homology to the PIN domain and according to experimental data on other VapC proteins, it probably acts as an endoribonuclease (Winther and Gerdes, 2011; McKenzie *et al.*, 2012a). A set of RNA/mRNA molecules could be affected by VapC-5, among them those which are functionally symbiosis related (Fig. 11). This was suggested by the continuously decreasing expression of *nif* genes in the nodules elicited by the mutant BM210 (Fig. 7). Recently, McKenzie and colleagues (2012b) have shown that a VapC toxin of *M. smegmatis* targeted the mRNA of a set of genes in a sequence-specific manner, acting as a post-transcriptional regulator of metabolic flux.

In the absence of a functional toxin (strain UNA405), bacteria developed a more efficient symbiosis resulting in a considerable improvement of plant yield (Fig. 9). This may be due to an increase of RNA/mRNA of symbiotic importance involved in bacteroid survival (Fig. 11). In the cells devoid of functional VapC-5, TA complex is not formed, and the TA operon may be not or less efficiently repressed. It is intriguing why these bacteria are more proficient in symbiosis when, in contrast, the complete deletion of the *vapBC-5* module (strain GC140) has no detectable phenotype in symbiosis. These results could be explained if interactions among the TA modules may exist. The free VapB-5 antitoxin may cross-react with toxin components of other similar TA modules. The chromo-

some of *S. meliloti* carries additional 10 *vapBC*-type TA systems, and four of these modules encode AbrB-PIN domain-type proteins (SMc01177/SMc01176, SMc02657/SMc02658 and SMc04881/SMc04408, the proteins of the fourth module NtrPR seem to be unable to interact with the operator region of *vapBC-5*). Such interactions may disturb the ratio of T and A components of additional modules, resulting in pleiotropic effects and remarkable changes of the T : A ratio-dependent expression levels (Diaz-Orejas *et al.*, 2010).

Examples for the interaction of TA modules have already been described. VapC proteins of *Salmonella* or *Shigella*, when ectopically expressed in *E. coli*, trans-activated YoeB mRNA interferase (Winther and Gerdes, 2009). Purified proteins of the Kis/Kid and CcdA/CcdB systems were used to demonstrate complex formation and functional cross-talk between the toxin and antitoxin components (Smith *et al.*, 2012). Recently, Kasari and colleagues (2013) demonstrated that overexpression of a toxin not only destabilizes binding of the TA complex to its own operator region, but the toxin can also cross-activate the transcription of other TA operons in *E. coli*. Interestingly, associations between noncognate toxin-antitoxin pairs belonging to different TA families have also been shown in *Mycobacterium tuberculosis* (Zhu *et al.*, 2010).

The root nodules induced by the strain UNA405 had increased size and delayed senescent phenotype, since no senescent zone could be observed 6 wpi. Such a delayed senescent phenotype, due to modified bacterial gene expression, has rarely been described (Dupont *et al.*, 2012). One example is the overexpression of a flavodoxin gene of *Anabaena variabilis* in *S. meliloti*, resulting in delayed senescence and better antioxidant metabolism of bacteroids in alfalfa root nodules (Redondo *et al.*, 2009). The other example is the overexpression of the *S. meliloti* *hmp* gene encoding a flavohaemoglobin resulting in a decrease of nitric oxide levels and a significant delay in nodule senescence (Cam *et al.*, 2012). Whether the delayed senescence of nodules induced by the strain UNA405 is due to a better antioxidant metabolism, or to an improved response to various stress conditions, remains to be determined. Data obtained with the strain UNA405 demonstrated that two genes, leghaemoglobin and NCR001 (Nodule Cysteine Rich peptide) encoded by the plant genome were also expressed at an elevated level (Fig. 10). The increased production of NCR001 involved in later steps of bacteroid differentiation (Mergaert *et al.*, 2003; Haag *et al.*, 2011) suggests a role for this peptide in the plant-bacterium interaction and bacteroid viability.

Since *Medicago* is a widely cultivated forage legume, the enhancement of its production has economic and agronomic importance. The *vapC-5* mutant strain could

be a symbiotic partner of choice providing an increased plant yield and longer plant–bacterium interaction period. Inactivation of additional toxin genes of *S. meliloti* may provide a strategy to further improve alfalfa production.

Experimental procedures

Bacterial growth conditions

Escherichia coli strains were grown at 37°C in Luria–Bertani (LB) medium (Maniatis *et al.*, 1982) supplemented with antibiotics when appropriate (ampicillin 100 µg ml⁻¹, tetracycline 10 µg ml⁻¹, gentamicin 10 µg ml⁻¹ and kanamycin 50 µg ml⁻¹). *Sinorhizobium meliloti* strains were grown at 31°C in TA medium (Kondorosi *et al.*, 1984) or in modified LB medium containing 2.5 mM MgSO₄ and 2.5 mM CaCl₂, and supplemented with antibiotics (streptomycin 200 µg ml⁻¹; neomycin 200 µg ml⁻¹; gentamicin 50 µg ml⁻¹ and tetracycline 15 µg ml⁻¹) when appropriate. Where indicated, luteolin was added to the bacterial cultures at OD₆₀₀ of 0.1 at a final concentration of 10 µM. After further growth, β-galactosidase measurements were performed at OD₆₀₀ of 0.5.

Construction of bacterial strains and plasmids

Oligonucleotide primers are listed in Table S1. Bacterial strains and plasmids are listed in Table S2. Two wild-type *S. meliloti* strains, Sm1021 and Sm2011, and their *vapBC-5* mutant derivatives (BM210, GC140 and UNA405 respectively) were used in this study. Both wild-type strains are derivatives of the field isolate *S. meliloti* SU47. Data published up to now on these strains do not indicate any difference in their symbiotic capacity when interacting with *M. sativa*, the host plant used in our study. All published symbiotic diversity related to Sm1021 and Sm2011 were detected when *M. truncatula* was applied as a host plant (Terpolilli *et al.*, 2008). For example, differences in *nod* gene activation [due to a point mutation in the *nodR* gene (Cren *et al.*, 1994)] and in root hair calcium spiking (Wais *et al.*, 2002) were observed only when these *S. meliloti* strains interacted with *M. truncatula*. It is relevant for the present study that the sequence comparison of the entire *vapBC-5* DNA regions (TA coding genes and putative promoter regions) of Sm1021 and Sm2011 demonstrated 100% identity of the two strains.

In all experiments of this study, the properties of the examined mutant strains were always compared with their corresponding wild-type parents as controls. Therefore, all evidence and data support the conclusion that the observed symbiotic phenotypes are due to the mutations in the *vapBC-5* region, and not to the genetic background of the two strains.

BM210 is a mutant derivative of *S. meliloti* 1021, carrying insertion of a gentamicin (Gm) resistance cassette in the *vapB5* gene. To construct this strain, the primers *vapBC-5-2* and *vapBC-5-1* were used to amplify a 660 bp PCR fragment carrying the *vapBC-5* operon. This fragment was cloned in the XhoI site of pBluescript resulting in pBM194. The 1004 bp Gm^r cassette, present on a BamHI fragment from the plasmid pMS266 (Becker *et al.*, 1995) was inserted in the unique BclI

site of this construct at the 201st bp of the *vapB5* gene, resulting pBM204. The 1695 bp KpnI/PstI fragment of this construct carrying *vapBC-5* with the inserted Gm^r cassette was cloned in the SmaI site of pK18*mobsacB* (Schäfer *et al.*, 1994), resulting pBM205. This recombinant plasmid was introduced into the *S. meliloti* 1021 wild-type strain. Double recombinants were selected as published before (Schäfer *et al.*, 1994) and were confirmed by Southern hybridization. GC140 is a derivative of *S. meliloti* 1021 lacking the complete *vapBC-5* module. To construct this strain, a 1137 bp fragment upstream of *vapB-5* gene was amplified by PCR using AT1prom1 and AT1prom2 primers. This fragment was cloned in the EcoRV/SmaI site of pBluescript, resulting in the plasmid pGC127. Since PCR amplification of the downstream region of *vapBC-5* from genomic DNA was unsuccessful, first a 3849 bp EcoRI fragment was isolated from the genome of the BM210 strain carrying *vapBC-5* with the upstream and downstream regions and the GmR cassette in the *vapB-5* gene. This genomic fragment was inserted in the EcoRI site of pBluescript, hence obtaining pGC124. A 1124 bp EcoRI/SphI fragment was isolated from pGC124 carrying the last 35 bp of *vapC-5* and the region downstream of this gene. This fragment was cloned in the EcoRV site of pBluescript, obtaining pGC126. The 1161 HindIII (blunt)/SpeI fragment of pGC127 was inserted in the BamHI (blunt)/SpeI site of pGC126, resulting in the plasmid pGC131. The GmR cassette present on a 1004 bp BamHI fragment from pMS266 (Becker *et al.*, 1995) was inserted in the unique SmaI site of pGC131, between the upstream and downstream regions of *vapBC-5*, resulting in pGC132. The 3368 bp SacI (blunt)/Sall fragment of this construct was cloned into the SmaI/Sall site of the mobilizable broad-host-range vector pK18*mobsacB*, obtaining pGC133. This construct was transferred by conjugation to the *S. meliloti* 1021 wild-type strain, and double recombinants were selected. The obtained recombinants were confirmed by Southern hybridization. pRB119: a 236 bp fragment containing the *vapB5* gene was amplified by PCR reaction by using AT1antit1 and AT1antit2 primers. This fragment was inserted in the EcoRV site of pBluescript obtaining pRB111. The 273 bp SmaI/Sall fragment of this construct carrying the *vapB-5* gene was isolated and cloned in the SmaI/Sall site of the pBAD24 vector (Guzman *et al.*, 1995) resulting in a construct carrying the *vapB-5* gene fused downstream to the arabinose-inducible promoter in pBAD24. pRB114: a 432 bp fragment carrying the *vapC-5* gene was amplified by PCR reaction by using the AT1t1 and AT1t2 primers. This fragment was cloned in the SmaI site of pBAD24, hence fused downstream to the arabinose-inducible promoter. pRB121: a 666 bp fragment carrying the *vapB-5* antitoxin and *vapC-5* toxin coding genes was amplified by the AT1antit1 and AT1t2 primer pair. This fragment was inserted in the SmaI site of pBAD24, obtaining a construct where the entire *vapBC-5* coding region is fused to the arabinose-inducible promoter. To construct the *vapBC-5* promoter::*lacZ* fusion, a 1131 bp fragment of the *vapBC-5* promoter region was amplified by PCR reaction using the primers AT1prom1 and AT1prom2. This fragment was end digested with EcoRI and cloned in the EcoRV/EcoRI site of pBluescript, obtaining pRB92. The 1145 bp HindIII/PstI fragment of this construct, carrying the *vapBC-5* promoter region was isolated and cloned in the HindIII/PstI site of the

broad-host-range vector pEP82 (Élő *et al.*, 1998) upstream of the *lacZ* reporter gene. The resulting construct, pRB96 was used in β -galactosidase measurements for detecting *vapBC-5* promoter activity.

DNA manipulations and sequence analysis

Plasmids were transferred into *S. meliloti* strains by conjugation using the triparental mating system (Ditta *et al.*, 1980). Preparation of plasmid DNA, digestion with restriction enzymes, agarose gel electrophoresis, fragment isolation, cloning procedures and transformation of *E. coli* cells were performed according to Maniatis and colleagues (1982). Enzymes used for restriction and modification of DNA samples were obtained from Fermentas. Deoxyribonucleic acid sequencing was performed with the BIG DYE TERMINATOR v 3.0 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems ABI PRISM).

RNA isolation from bacterial cultures and RT-PCR analysis

Total RNA was isolated from bacterial cultures using a Qiagen RNeasy Minikit. The amount and purity of isolated RNA was determined with a HITACHI U-1800 spectrophotometer. For first-strand cDNA synthesis, 1 μ g of total RNA was reverse transcribed using random hexamer primers and reverse transcriptase (Roche) in a total volume of 20 μ l. One μ l 50-fold diluted cDNA was used in PCR. The following oligonucleotide primers were used: for *vapB-5* antitoxin gene, RT-AT-1 and RT-AT-2; for *vapC-5* toxin gene, RT-T-1 and RT-T-2. The resulting PCR fragment lengths were 149 bp for *vapB-5* and 125 bp for *vapC-5*.

Isolation of nodule RNA and quantitative RT-PCR analysis

Hundred milligrams of root nodules from *M. sativa* inoculated with wild-type *S. meliloti* 2011, or UNA405 (*vapC-5* mutant) strains were harvested 6 weeks post-inoculation (wpi). Nodules were manually split into two parts and frozen at -80°C . Total RNA from each half was isolated using Trizol (Invitrogen) and then submitted to TURBO DNase (Life Technologies) treatment. For cDNA synthesis, 500 ng of total RNA were reverse transcribed with Takara BluePrint One-Step RT-PCR Kit (Fisher Scientific). Quantitative PCR was performed using a DNA Engine Opticon 2 continuous Fluorescence Detection system (MJ Research, Bio-Rad, Marnes-la-coquette, France) and GoTaq qPCR Master Mix (Promega). In each reaction, 5 μ l of 100-fold diluted cDNA and 0.3 μM primers were used. The PCR conditions were 95°C for 10 min, followed by 39 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 1 min. Each reaction was performed in triplicate, and the results shown are the means of three independent biological experiments. The RT-qPCR data were quantified using Opticon Monitor 2 (MJ Research) and analysed with RQPCRBASE, an R package working on the R computing environment for analysis of quantitative real-time PCR data (T. Tran and F. Hilliou, unpublished). The mRNA levels were normalized against two constitutively expressed endogenous

genes, *mtc27* (Favery *et al.*, 2002) and the 40S ribosomal protein S8 gene (Fedorova *et al.*, 2002), selected as reference genes. The specificity of the amplification was confirmed by a single peak in a dissociation curve at the end of the PCR procedure. For each experiment, the stability of the reference genes was tested using GENORM software. The forward and reverse primers used for amplification of NCR001 (MtNCR001F and MtNCR001R), leghaemoglobin (MtLeghF and MtLeghR), *mtc27* (Mtc27F and Mtc27R) and 40S ribosomal protein S8 (40SF and 40SR) genes are listed in Table S1.

Viability tests and β -galactosidase measurements

Viability tests were done as described by Bodogai and colleagues (2006). β -Galactosidase measurements from cultures of free-living bacteria and plant nodules were carried out as described previously (Oláh *et al.*, 2001).

Plant tests

Nodulation tests were performed either in test tubes to facilitate the counting of the number of nodules, or in pots using sand/vermiculite mixture. *Medicago sativa* cv Irisz or cv Europe were used as host plants. Seeds were treated as described earlier (Oláh *et al.*, 2001). In test tubes, the seedlings were grown on agar slopes on nitrogen-free Gibson medium and were inoculated with the appropriate bacterial strains on the third day. The number of root nodules was counted every fourth day. Shoots were collected after 2 months, and dried for 40 h at 65°C for dry weight measurements. For a better evaluation of increased yield by the mutant strain UNA405, plants were grown in pots in sand/vermiculite mixture (1:2, v/v) in a phytotron using 16 h light/8 h dark photoperiod at 23°C . Plantlets were inoculated on the fifth day with 200 μ l bacterial culture of $\text{OD}_{600} = 0.01$. Nitrogen fixation activity was determined by the acetylene reduction assay as described previously (Hérouart *et al.*, 1996). Plants were harvested 6 wpi for shoot dry weight measurements.

Microscopy

Nodules elicited by strains *S. meliloti* 1021 and its derivatives were cut from plant roots 50 days after infection and fixed with 4% paraformaldehyde for 30 min. After washing, nodules were embedded in 5% agarose gel, 60 μm thin sections were cut with vibratome and stained with 2% toluidine blue. For ultrastructure observation, nodules elicited either by the strain *S. meliloti* 2011 and its derivative UNA405, or by the strain *S. meliloti* 1021 and its derivative BM210 were fixed in 1% glutaraldehyde, 4% formaldehyde in 0.1 M phosphate buffer at pH7.2, washed, dehydrated and embedded in Technovit 7100 (Kulzer Histo-Technik, Wehrheim, Germany) according to the manufacturer's instructions. Sections (5 μm) cut on a microtome (Jung) and stained with toluidine blue were mounted in distyrene plasticizer xylene mounting solution (VWR International, Lille, France) and examined under an Imager Z.1 (Zeiss, Le Pecq, France) microscope coupled to an Axiocam MRm camera (Zeiss, Le Pecq, France).

Statistical analyses

The significance of differences was assessed with Student's *t*-test using R software for qPCR data analysis. An Anova Bonferroni test was used for β -galactosidase assays using GRAPHPAD PRISM software.

Acknowledgements

The authors would like to thank E. Fejes for the critical reading of the manuscript and for Pierre Frendo for helpful and constructive discussions. We thank R. Bognar for providing the plasmids pRB119, pRB114 and pRB121. The photographic work of M. Toth is greatly appreciated. Justine Lipuma was recipient of a doctoral grant from the French Ministère de l'Education Nationale de la Recherche et de Technologie. This work was supported by the grant of the Hungarian National Scientific Research Foundation OTKA NK105852 and by the French National Research Agency ANR through the 'Investments for the Future' Labex Signalife: programme ANR-11-LABX-0028-01. We thank the Microscopy Platform-Sophia Agrobiotech Institut -INRA 1355-UNSCNRS 7254- INRA PACA-Sophia Antipolis for the access to instruments and technical advice.

References

- Arcus, V.A., McKenzie, J.L., Robson, J., and Cook, G.M. (2011) The PIN-domain ribonucleases and the prokaryotic VapBC toxin-antitoxin array. *Protein Eng Des Sel* **24**: 33–40.
- Becker, A., Schmidt, M., Jäger, W., and Pühler, A. (1995) New gentamicin-resistance and *lacZ* promoter-probe cassettes suitable for insertion mutagenesis and generation of transcriptional fusions. *Gene* **162**: 37–39.
- Blower, T.R., Short, F.L., Rao, F., Mizuguchi, K., Pei, X.Y., Fineran, P.C., *et al.* (2012) Identification and classification of bacterial type III toxin–antitoxin systems encoded in chromosomal and plasmid genomes. *Nucleic Acids Res* **40**: 6158–6173.
- Bodogai, M., Ferenczi, S., Bashtovyy, D., Miclea, P., Papp, P., and Dusha, I. (2006) The *ntrPPR* operon of *Sinorhizobium meliloti* is organized and functions as a toxin–antitoxin module. *Mol Plant Microbe Interact* **19**: 811–822.
- Cam, Y., Pierre, O., Boncompagni, E., Hérouart, D., and Meilhoc, E. (2012) Nitric oxide (NO): a key player in the senescence of *Medicago truncatula* root nodules. *New Phytol* **196**: 548–560.
- Christensen, S.K., Mikkelsen, M., Pedersen, K., and Gerdes, K. (2001) RelE, a global inhibitor of translation, is activated during nutritional stress. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 14328–14333.
- Cren, M., Kondorosi, A., and Kondorosi, E. (1994) An insertional point mutation inactivates NolR repressor in *Rhizobium meliloti* 1021. *J Bacteriol* **176**: 518–519.
- Dénarié, J., Debelle, F., and Promé, J.-C. (1996) Rhizobium lipochitooligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annu Rev Biochem* **65**: 503–535.
- Diaz-Orejas, R., Diago-Navarro, E., Hernández Arriaga, A.M., López-Villarejo, J., Lemonnier, M., Moreno-Córdoba, I., *et al.* (2010) Bacterial toxin-antitoxin systems targeting translation. *J Appl Biomed* **8**: 179–188.
- Ditta, G., Stanfield, S., Corbin, D., and Helinski, D.R. (1980) Broad host range DNA cloning system for gram-negative bacteria: construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. *Proc Natl Acad Sci USA* **77**: 7347–7351.
- Dupont, L., Alloing, G., Pierre, O., El Msehli, S., Hopkins, J., Hérouart, D., and Frendo, P. (2012) The legume root nodule: from symbiotic nitrogen fixation to senescence. In *Senescence*. Nagata, T. (ed.). Rijeka, Croatia: InTech, pp. 137–168.
- Dusha, I., Bakos, Á., Kondorosi, Á., de Bruijn, F.J., and Schell, J. (1989) The *Rhizobium meliloti* early nodulation genes (*nodABC*) are nitrogen-regulated: isolation of a mutant strain with efficient nodulation capacity on alfalfa in the presence of ammonium. *Mol Gen Genet* **219**: 89–96.
- Élő, P., Semsey, S., Kereszt, A., Nagy, T., Papp, P., and Orosz, L. (1998) Integrative promoter cloning plasmid vectors for *Rhizobium meliloti*. *FEMS Microbiol Lett* **159**: 7–13.
- Engelberg-Kulka, H., and Glaser, G. (1999) Addiction modules and programmed cell death and antideath in bacterial cultures. *Annu Rev Microbiol* **53**: 43–70.
- Favery, B., Complainville, A., Vinardell, J.M., Lecomte, P., Vaubert, D., Mergaert, P., *et al.* (2002) The endosymbiosis-induced genes ENOD40 and CCS52a are involved in endoparasitic-nematode interactions in *Medicago truncatula*. *Mol Plant Microbe Interact* **15**: 1008–1013.
- Fedorova, M., van de Mortel, J., Matsumoto, P.A., Cho, J., Town, C.D., VandenBosch, K.A., *et al.* (2002) Genome-wide identification of nodule-specific transcripts in the model legume *Medicago truncatula*. *Plant Physiol* **130**: 519–537.
- Fischer, H.M. (1994) Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia. *Microbiol Rev* **58**: 352–386.
- Fozo, E.M., Hemm, M.R., and Storz, G. (2008) Small toxic proteins and the antisense RNAs that repress them. *Microbiol Mol Biol Rev* **72**: 579–589.
- Frampton, R., Aggio, R.B.M., Villas-Bôas, S.G., Arcus, V.L., and Cook, G.M. (2012) Toxin-antitoxin systems of *Mycobacterium smegmatis* are essential for cell survival. *J Biol Chem* **287**: 5340–5356.
- Gerdes, K., and Wagner, E.G. (2007) RNA antitoxins. *Curr Opin Microbiol* **10**: 117–124.
- Gerdes, K., Helin, K., Christensen, O.W., and Løbner-Olesen, A. (1988) Translational control and differential RNA decay are key elements regulating postsegregational expression of the killer protein encoded by the *parB* locus of plasmid R1. *J Mol Biol* **203**: 119–129.
- Gerdes, K., Christensen, S.K., and Løbner-Olesen, A. (2005) Prokaryotic toxin–antitoxin stress response loci. *Nat Rev Microbiol* **3**: 371–382.
- Gibson, K.E., Kobayashi, H., and Walker, G.C. (2008) Molecular determinants of a symbiotic chronic infection. *Annu Rev Genet* **42**: 413–441.
- Goeders, N., and Van Melderden, L. (2014) Toxin–antitoxin systems as multilevel interaction systems. *Toxins (Basel)* **6**: 304–324.
- Guzman, L.M., Belin, D., Carson, M.J., and Beckwith, J. (1995) Tight regulation, modulation, and high-level

- expression by vectors containing the arabinose P(BAD) promoter. *J Bacteriol* **177**: 4121–4130.
- Haag, A.F., Balaban, M., Sanj, M., Kerscher, B., Pierre, O., Farkas, A., et al. (2011) Protection of *Sinorhizobium* against host cysteine-rich antimicrobial peptides is critical for symbiosis. *PLoS Biol* **9**: e1001169.
- Hazan, R., Sat, B., and Engelberg-Kulka, H. (2004) *Escherichia coli* mazEF-mediated cell death is triggered by various stressful conditions. *J Bacteriol* **186**: 3663–3669.
- Hérouart, D., Sigaud, S., Moreau, S., Frendo, P., Touati, D., and Puppo, A. (1996) Cloning and characterization of the *katA* gene of *Rhizobium meliloti* encoding a hydrogen peroxide-inducible catalase. *J Bacteriol* **178**: 6802–6809.
- Jones, K.M., Kobayashi, H., Davies, B.W., Taga, M.E., and Walker, G.C. (2007) How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium-Medicago* model. *Nat Rev Microbiol* **5**: 619–633.
- Kasari, V., Mets, T., Tenson, T., and Kaldalu, N. (2013) Transcriptional cross-activation between toxin–antitoxin systems of *Escherichia coli*. *BMC Microbiol* **13**: 45.
- Kim, Y., Wang, X., Ma, Q., Zhang, X.-S., and Wood, T.K. (2009) Toxin–antitoxin systems in *Escherichia coli* influence biofilm formation through YjgK (TabA) and fimbriae. *J Bacteriol* **191**: 1258–1267.
- Kolodkin-Gal, I., Hazan, R., Gaathon, A., Carmeli, S., and Engelberg-Kulka, H. (2007) A linear pentapeptide is a quorum-sensing factor required for mazEF-mediated cell death in *Escherichia coli*. *Science* **318**: 652–655.
- Kondorosi, E., Bánfalvi, Z., and Kondorosi, Á. (1984) Physical and genetic analysis of a symbiotic region of *Rhizobium meliloti*: identification of nodulation genes. *Mol Gen Genet* **193**: 445–452.
- Leplae, R., Geeraerts, D., Hallez, R., Guglielmini, J., Drèze, P., and Van Melderen, L. (2011) Diversity of bacterial type II toxin–antitoxin systems: a comprehensive search and functional analysis of novel families. *Nucleic Acids Res* **39**: 5513–5525.
- McKenzie, J.L., Duyvestyn, J.M., Smith, T., Bendak, K., MacKay, J., Cursons, R., et al. (2012a) Determination of ribonuclease sequence-specificity using pentaprobates and mass spectrometry. *RNA* **18**: 1267–1278.
- McKenzie, J.L., Robson, J., Berney, M., Smith, T.C., Ruthe, A., Gardner, P.P., et al. (2012b) A VapBC toxin–antitoxin module is a posttranscriptional regulator of metabolic flux in mycobacteria. *J Bacteriol* **194**: 2189–2204.
- Magnuson, R.D. (2007) Hypothetical functions of toxin–antitoxin systems. *J Bacteriol* **189**: 6089–6092.
- Maisonneuve, E., Shakespeare, L.J., Jørgensen, M.G., and Gerdes, K. (2011) Bacterial persistence by RNA endonucleases. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**: 13206–13211.
- Makarova, K.S., Aravind, L., Galperin, M.Y., Grishin, N.V., Tatusov, R.L., Wolf, Y.I., and Koonin, E.V. (1999) Comparative genomics of the Archaea (Euryarchaeota): evolution of conserved protein families, the stable core and the variable shell. *Genome Res* **9**: 608–628.
- Makarova, K.S., Wolf, Y.I., and Koonin, E.V. (2009) Comprehensive comparative-genomic analysis of type 2 toxin–antitoxin systems and related mobile stress response systems in prokaryotes. *Biol Direct* **4**: 19.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., and Sambrook, J.E. (1982) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor.
- Mergaert, P., Nikovics, K., Kelemen, Z., Maunoury, N., Vaubert, D., Kondorosi, A., and Kondorosi, E. (2003) A novel family in *Medicago truncatula* consisting of more than 300 nodule-specific genes coding for small, secreted polypeptides with conserved cysteine motifs. *Plant Physiol* **132**: 161–173.
- Miclea, P.S., Péter, M., Végh, G., Cinege, G., Kiss, E., Váró, G., et al. (2010) Atypical transcriptional regulation and role of a new toxin–antitoxin-like module and its effect on the lipid composition of *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol Plant Microbe Interact* **23**: 638–650.
- Mulligan, S.T., and Long, S.R. (1985) Induction of *Rhizobium meliloti* nodC expression by plant exudate requires nodD. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**: 6609–6613.
- Oláh, B., Kiss, E., Györgypál, Z., Borzi, J., Cinege, G., Csanádi, G., et al. (2001) Mutation in the *ntrR* gene, a member of the *vap* gene family, increases the symbiotic efficiency of *Sinorhizobium meliloti*. *Mol Plant Microbe Interact* **14**: 887–894.
- Pandey, D.P., and Gerdes, K. (2005) Toxin–antitoxin loci are highly abundant in free-living but lost from host-associated prokaryotes. *Nucleic Acids Res* **33**: 966–976.
- Peck, M.C., Fisher, R.F., and Long, S.R. (2006) Diverse flavonoids stimulate NodD1 binding to nod gene promoters in *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **188**: 5417–5427.
- Pedersen, K., Zavalov, A.V., Pavlov, N.Y., Elf, J., Gerdes, K., and Ehrenberg, M. (2003) The bacterial toxin RelE displays codon-specific cleavage of mRNAs in the ribosomal A site. *Cell* **112**: 131–140.
- Pobigajlo, M., Wetter, D., Szyczak, S., Schiller, U., Kurtz, S., Meyer, F., et al. (2006) Construction of a large signature-tagged mini-Tn5 transposon library and its application to mutagenesis of *Sinorhizobium meliloti*. *Appl Environ Microbiol* **72**: 4329–4337.
- Puskás, L.G., Nagy, Z.B., Kelemen, J.Z., Rüberg, S., Bodogai, M., Becker, A., and Dusha, I. (2004) Wide-range transcriptional modulating effect of *ntrR* under microaerobiosis in *Sinorhizobium meliloti*. *Mol Genet Genomics* **272**: 275–289.
- Ramage, H.R., Connolly, L.E., and Cox, J.S. (2009) Comprehensive functional analysis of *Mycobacterium tuberculosis* toxin–antitoxin systems: implications for pathogenesis, stress responses and evolution. *PLoS Genet* **5**: e1000767.
- Redondo, F.J., de la Pena, T.C., Morcillo, C.N., Lucas, M.M., and Pueyo, J.J. (2009) Overexpression of flavodoxin in bacteroids induces changes in antioxidant metabolism leading to delayed senescence and starch accumulation in alfalfa root nodules. *Plant Physiol* **149**: 1166–1178.
- Sat, B., Hazan, R., Fisher, T., Khaner, H., Glaser, G., and Engelberg-Kulka, H. (2001) Programmed cell death in *Escherichia coli*: some antibiotics can trigger mazEF lethality. *J Bacteriol* **183**: 2041–2045.
- Schäfer, A., Tauch, A., Jäger, W., Kalinowski, J., Thierbach, G., and Pühler, A. (1994) Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* **145**: 69–73.

- Schultze, M., Kondorosi, E., Ratet, P., Buiré, M., and Kondorosi, A. (1994) Cell and molecular biology of *Rhizobium*-plant interactions. *Int Rev Cytol* **156**: 1–75.
- Sevin, E.W., and Barloy-Hubler, F. (2007) RASTA-bacteria: a web-based tool for identifying toxin–antitoxin loci in prokaryotes. *Genome Biol* **8**: R155.
- Shao, Y., Harrison, E.M., Bi, D., Tai, C., He, X., Ou, H.-Y., et al. (2011) TADB: a web-based resource for type2 toxin–antitoxin loci in bacteria and archaea. *Nucleic Acids Res* **39**: D606–D611.
- Smith, A.B., López-Villarejo, J., Diago-Navarro, E., Mitchenall, L.A., Barendregt, A., Heck, A.J., et al. (2012) A common origin for the bacterial toxin–antitoxin systems *parD* and *ccd*, suggested by analyses of toxin/target and toxin/antitoxin interactions. *PLoS ONE* **7**: e46499.
- Strauch, M.A., Spiegelman, B.G., Perego, M., Johnson, W.C., Burbulys, D., and Hoch, J.A. (1989) The transition state transcription regulator *abrB* of *Bacillus subtilis* is a DNA binding protein. *EMBO J* **8**: 1615–1621.
- Syed, M.A., and Lévesque, C.M. (2012) Chromosomal bacterial type II toxin–antitoxin systems. *Can J Microbiol* **58**: 553–562.
- Terpolilli, T.J., O'Hara, G.W., Tiwari, R.P., Dilworth, M.J., and Howieson, J.G. (2008) The model legume *Medicago truncatula* A17 is poorly matched for N₂ fixation with the sequenced microsymbiont *Sinorhizobium meliloti* 1021. *New Phytol* **179**: 62–66.
- Tsilibaris, V., Maenhaut-Michel, G., Mine, N., and Van Melderren, L. (2007) What is the benefit to *Escherichia coli* of having multiple toxin–antitoxin systems in its genome? *J Bacteriol* **189**: 6101–6108.
- Van de Velde, W., Guerra, J.C., De Keyser, A., De Rycke, R., Rombauts, S., Maunoury, N., et al. (2006) Aging in legume symbiosis. A molecular view on nodule senescence in *Medicago truncatula*. *Plant Physiol* **141**: 711–720.
- Van Melderren, L. (2010) Toxin–antitoxin systems: why so many, what for? *Curr Opin Microbiol* **13**: 781–785.
- Vasse, J., de Billy, F., Camut, S., and Truchet, G. (1990) Correlation between ultrastructural differentiation of bacteroids and nitrogen fixation in alfalfa nodules. *J Bacteriol* **172**: 4295–4306.
- Wais, R.J., Wells, D.H., and Long, S.R. (2002) Analysis of differences between *Sinorhizobium meliloti* 1021 and 2011 strains using the host calcium spiking response. *Mol Plant Microbe Interact* **15**: 1245–1252.
- Wall, D., and Kaiser, D. (1999) Type IV pili and cell motility. *Mol Microbiol* **32**: 1–10.
- Winther, K.S., and Gerdes, K. (2009) Ectopic production of VapCs from *Enterobacteria* inhibits translation and *trans*-activates YoeB mRNA interferase. *Mol Microbiol* **72**: 918–930.
- Winther, K.S., and Gerdes, K. (2011) Enteric virulence associated protein VapC inhibits translation by cleavage of initiator tRNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**: 7403–7407.
- Yamaguchi, Y., and Inouye, M. (2011) Regulation of growth and death in *Escherichia coli* by toxin–antitoxin systems. *Nat Rev Microbiol* **9**: 779–790.
- Zhang, Y., Zhang, J., Hoeflich, K.P., Ikura, M., Qing, G., and Inouye, M. (2003) MazF cleaves cellular mRNAs specifically at ACA to block protein synthesis in *Escherichia coli*. *Mol Cell* **12**: 913–923.
- Zhu, L., Sharp, J.D., Kobayashi, H., Woychik, N.A., and Inouye, M. (2010) Noncognate *Mycobacterium tuberculosis* toxin–antitoxins can physically and functionally interact. *J Biol Chem* **285**: 39732–39738.

Supporting information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site:

Fig. S1. Detection of *vapB-5* antitoxin (A) and *vapC-5* toxin (T) transcription with RT-PCR in the wild-type strain *S. meliloti* 1021 and the mutants BM210 and GC140. As a negative control, an RNA sample of BM210 was used without adding reverse transcriptase during cDNA synthesis.

Fig. S2. Promoter activities of nodulation genes *nodD1* and *nodABC* in free-living wild-type and mutant *S. meliloti* strains. β -galactosidase activities expressed from plasmid pRmM61 (*nodD1-lacZ*) (A) and plasmid pRmM57 (*nodABC-lacZ*) (B) were measured from cultures of wild-type, BM210 and GC140 strains as described in Fig. 4. For *nodABC*, expression cells were induced by luteolin at 10 μ M final concentration for at least 2 h at OD₆₀₀ = 0.1. –L: without luteolin, +L: with luteolin induction. Activities calculated as Miller units were measured from parallel samples in at least three independent experiments.

Fig. S3. Comparison of the length of bacteroids developed in the nodules induced by the wild-type strain *S. meliloti* 1021 and its *vapB-5* mutant derivative BM210. The length of bacteroids was determined on thin sections of Sm1021 (white) and BM210 (grey) induced nodules in the nitrogen fixation zone III.

Table S1. Oligonucleotides.

Table S2. Bacterial strains and plasmids.

CONCLUSION DE LA PARTIE 2 :

LE SYSTEME VAPBC5 : ACTEUR CLEF DE LA SENESCENCE NODOSITAIRE ET DE L'EFFICACITE SYMBIOTIQUE

Dans ce travail, nous avons pu mettre en évidence le rôle d'un nouveau système VapBC de *S. meliloti* dans l'interaction symbiotique avec *M. sativa*. Pour la première fois, nous avons pu montrer qu'en invalidant la toxine d'un système TA, on pouvait retarder la sénescence nodositaire. Seulement deux exemples de retard d'entrée en sénescence nodositaire par surexpression de gènes bactériens ont été décrits dans la littérature. Il s'agit d'un mutant bactérien surexprimant une flavohémoglobine (Hmp++) impliquée dans la détoxification du NO (Cam et al., 2012). L'autre exemple porte sur la surexpression d'une flavodoxine d'*Anabaena variabilis* chez *S. meliloti* (Redondo et al., 2009). Comme nous l'avons décrit dans l'introduction bibliographique de ce manuscrit, bien que les premières étapes de reconnaissance et de mise en place de la symbiose soient bien documentées, peu de données sont aujourd'hui disponibles sur la mise en place du processus de sénescence. Le rôle des deux partenaires de l'interaction dans ce processus de rupture symbiotique reste encore à élucider. Il y a un réel enjeu à déterminer les acteurs clefs de la mise en place de ce processus. Dans le but d'apporter des éléments de réponse concernant le rôle du partenaire bactérien dans la sénescence nodositaire, nos travaux démontrent le rôle prépondérant d'un système TA de la famille VapBC dans cet arrêt symbiotique.

D'un point de vue agronomique, un des problèmes de cette rupture symbiotique est sa mise en place prématurée (sénescence induite) suite à des stress environnementaux (sécheresse, salinité des sols, etc...) conduisant alors à une perte de rendement végétal. Il en résulte, en champs, l'utilisation d'engrais azotés polluants pour pallier à l'interruption de la fixation d'azote. Sachant que l'expression des systèmes TA a été décrite dans la littérature comme induite par la perception de signaux de stress (oxydatif, température, hypoxie, etc...) (Ramage et al., 2009), une des questions serait de savoir si, parmi les systèmes TA de *S. meliloti*, certains ne seraient pas induits par des signaux abiotiques perçus par le bactéroïde *in planta*. Pour tester cette hypothèse, nous avons réalisé des études préliminaires, complémentaires à cette publication, en testant l'effet du stress salin sur la capacité

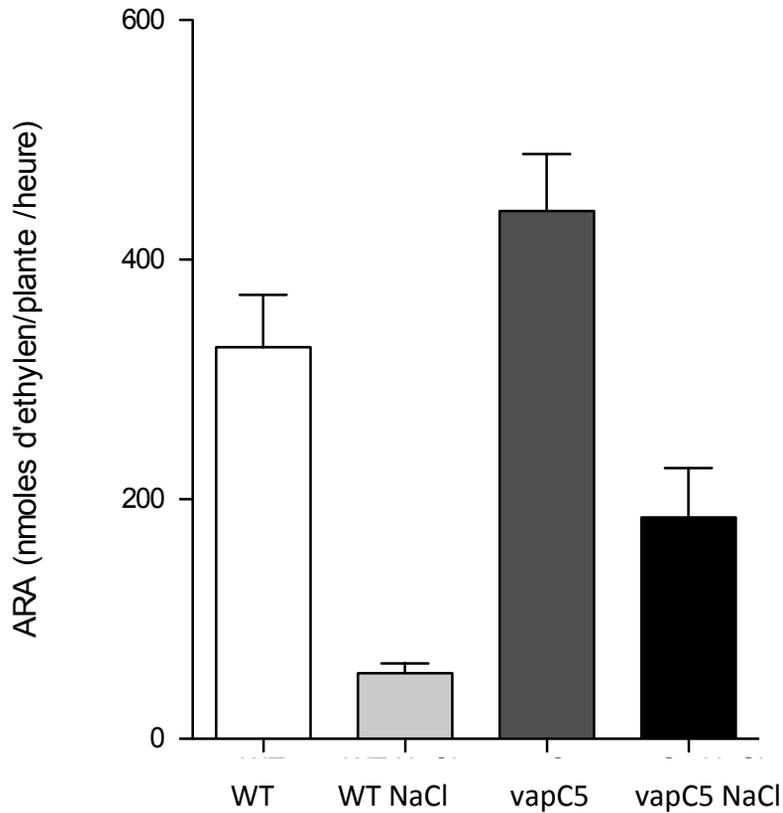


Figure 55 : Effet d'un stress salin sur la capacité fixatrice d'azote

La capacité fixatrice d'azote (ARA) a été mesurée 4 semaines après l'ajout de de NaCl 0,2M, sur des plantes de *M. sativa* âgées de 4 semaines post-inoculation. Les plantes ont été inoculées avec la souche WT (2011) ou la souche mutante *vapC5*.

fixatrice d'azote du couple *M. sativa*/mutant *vapC5* en comparaison du couple *M. sativa*/WT. Pour cela, un stress salin (NaCl à 0,2M) appliqué sur des plantes de *M. sativa* inoculées avec les souches WT ou mutante *vapC5* a été réalisé 4 semaines post-inoculation et cela pendant 4 semaines (en alternant un arrosage avec de l'eau et un avec un stress salin au cours de la semaine). L'activité de la nitrogénase (mesure d'ARA) a ensuite été déterminée et comparée à celle obtenue avec des plantes contrôles non soumises à un stress salin (**Figure 55**). Les résultats montrent, qu'avec la souche WT, un stress salin entraîne une chute de l'activité de la nitrogénase d'un facteur 6, alors que les plantes inoculées avec la souche mutante *vapC5* ne voient leur capacité fixatrice d'azote chuter que d'un facteur 2 (**Figure 55**). Dans cette analyse, l'ARA est déterminée par plante et non par poids de nodosités pour permettre de mieux visualiser l'effet du stress salin uniquement sur la fixation d'azote, celui-ci agissant également sur le poids des nodosités.

Un autre aspect intéressant de l'étude de ce module VapBC5 est lié au fait qu'un mutant *vapC5* présente un phénotype dépendant de la plante hôte. En effet, dans l'analyse globale du rôle des mutants *vapC* (Partie 1 Résultats, le mutant *vapC5*, en interaction avec *M. truncatula*, présente un phénotype Fix^{+/-}, opposé à celui décrit en interaction avec *M. sativa* (Fix⁺⁺). Le rôle de ces systèmes TA serait donc dépendant de la plante hôte, mettant en lumière le fait que cette interaction nécessite à tout moment un dialogue moléculaire entre les deux partenaires qui ne se limite pas uniquement au moment de la mise en place de la symbiose.

Dans cette étude, le mutant d'inactivation du gène de l'antitoxine présente un phénotype symbiotique opposé à celui induit par un mutant dans le gène de la toxine; avec, respectivement, un effet néfaste ou bénéfique sur le rendement végétal et l'efficacité symbiotique. Dans le cas où VapC5 agirait en tant que RNase, cela suggère que la libération de cette toxine conduirait à la dégradation d'ARNm symbiotique (**Figure 56**). Ainsi, l'absence de toxine dans la souche mutante *vapC5* entrainerait une préservation de ces ARNm bactériens essentiels à la symbiose (impliqués dans la fixation d'azote et/ou dans la résistance à des signaux de stress perçus par le bactéroïde) et permettrait ainsi un retard dans l'entrée en sénescence des bactéroïdes et de la nodosité.

De façon originale, un mutant de délétion de l'ensemble de l'opéron *vapBC5* n'entraîne aucun phénotype symbiotique. Dans ce contexte, le phénotype symbiotique observé avec la souche mutante *vapC5* pourrait ne pas être uniquement dû à l'absence de la toxine mais également à l'accumulation d'antitoxine VapB5. Celle-ci pourrait, via des interactions croisées, titrer d'autres toxines VapC de *S. meliloti* (**Figure 56**). De telles interactions entre

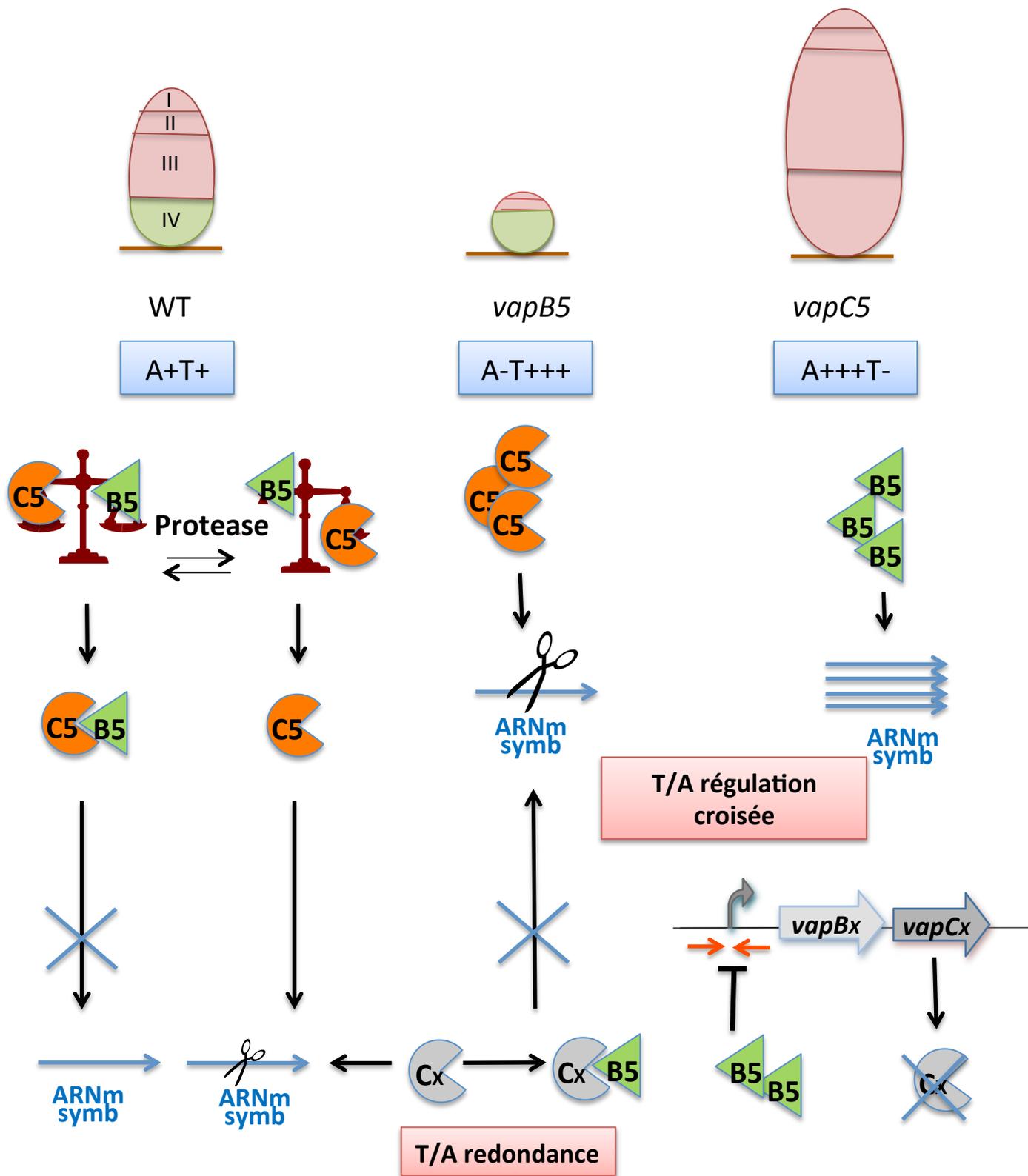


Figure 56 : Représentation schématique du rôle du module VapBC5 de *S. meliloti* dans un contexte WT, *vapB5* et *vapC5*

les protéines de modules TA différents ont été décrites dans la littérature (Yang et al., 2010). Il est également possible que l'antitoxine VapB5, dont la surexpression du gène dans un contexte *vapC5* a été montrée, pourrait réguler de façon négative d'autres opérons *vapBC*.

RESULTATS PARTIE 3 :

LE SYSTEME VAPBC7 :

UN SYSTEME TOXINE ANTITOXINE ESSENTIEL A LA SURVIE DE LA BACTERIE DANS LA CELLULE HOTE

Lors de notre analyse globale des systèmes VapBC de *S. meliloti* (Partie 1 Résultats), le module VapBC7 s'est immédiatement distingué. En effet, en plus de disposer d'un profil d'expression original avec une accumulation des transcrits de la toxine en zone III (zone fixatrice) et IV (zone de sénescence) de la nodosité, les plantes, en interaction avec le mutant d'inactivation de la toxine, présentaient un phénotype drastique de perte de la capacité fixatrice d'azote et de diminution du rendement végétal.

Ce phénotype très marqué était totalement contraire à celui obtenu pour les 2 seuls autres systèmes étudiés en condition symbiotique (VapBC4= NtrRP (Bodogai et al., 2006)) et VapBC5 (Lipuma et al., 2014).

Par conséquent, bien que le système VapBC7, qui par ailleurs semble avoir suivi le même chemin évolutif que VapBC4 et VapBC5 et présente des similitudes de séquences avec ces 2 systèmes, soit impliqué dans le processus symbiotique, il semble jouer un rôle totalement différent.

Les résultats obtenus suggèrent, de façon originale, un effet, « positif » de la toxine sur l'efficacité symbiotique en condition sauvage. Aussi, afin de préciser l'implication de ce système dans la symbiose, une étude approfondie apparaissait indispensable. A quelle étape du processus symbiotique est-il impliqué? Comment agit la toxine ? Pour répondre à ces questions, nous avons réalisé une étude détaillée de l'interaction entre *M. truncatula* et le mutant d'inactivation de la toxine VapC7 dont les résultats font l'objet de la publication en préparation présentée ci-après.

VapBC7, a new crucial Toxin-Antitoxin system of *Sinorhizobium meliloti* involved in bacteroids survival and efficient nitrogen fixation in its host plant *Medicago truncatula*

Justine Lipuma,¹ Isabelle Garcia,¹ Aurélie Kiers,¹ Raphaël Bonche,² Nicolas Pauly,¹ Ilona Dusha,³ and Laurence Dupont^{1,*}

¹ Institut Sophia Agrobiotech (ISA), INRA UMR 1355, CNRS UMR 7254, Université de Nice Sophia Antipolis, 400 Route des Chappes– BP167, Sophia Antipolis Cedex F-06903, France.

² Institut de Biologie Valrose (IBV/CNRS UMR7277/INSERM U1091), Parc Valrose, 28 avenue Valrose, 06108 Nice Cedex 2, France.

³ Institute of Genetics, Biological Research Center, Hungarian Academy of Sciences, P.O. Box 521, Szeged H-6701, Hungary.

*Correspondence: dupont@unice.fr (L.D.)

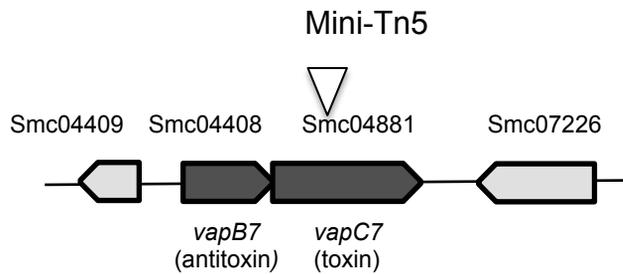
Results

***vapBC7* operon encodes a functional TA module expressed during symbiosis**

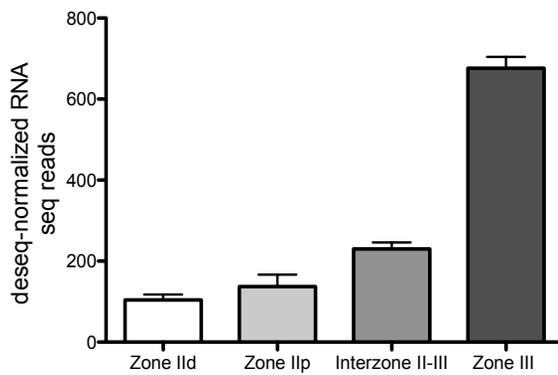
Among the 11 *vapBC* operons present on *S. meliloti* chromosome, two of them, *ntrPR* (Bodogai et al., 2006) and *vapBC5* (Lipuma et al., 2014), encode for Toxin-Antitoxin (TA) modules of symbiotic importance. Inactivation of the toxin component of these systems leads to an improved symbiotic efficiency and nitrogen fixation capacity, which can be associated to nodule delayed senescence for one of them (Lipuma et al., 2014). This raises the question of the role of the other putative VapBC modules of *S. meliloti* in the intracellular lifestyle of the bacteria in plant cells. Among the nine uncharacterized VapBC modules, we focused our attention on the *vapBC7* locus (so named by Pandey et al (Pandey and Gerdes, 2005) for two reasons: (i) the VapC7 toxin shares the best similarity to the *S. meliloti* VapC5 and NtrR1 proteins and (ii) the

Figure 1

A



B



C

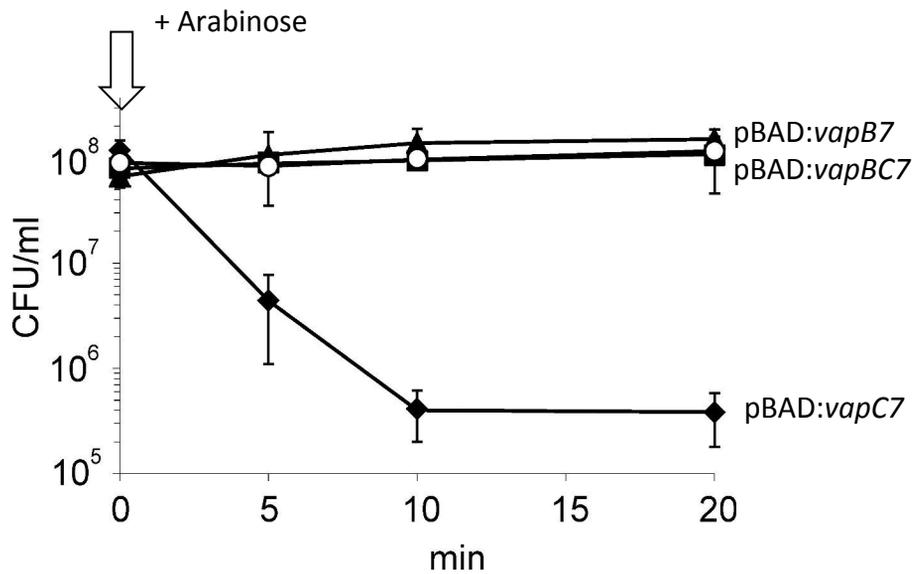
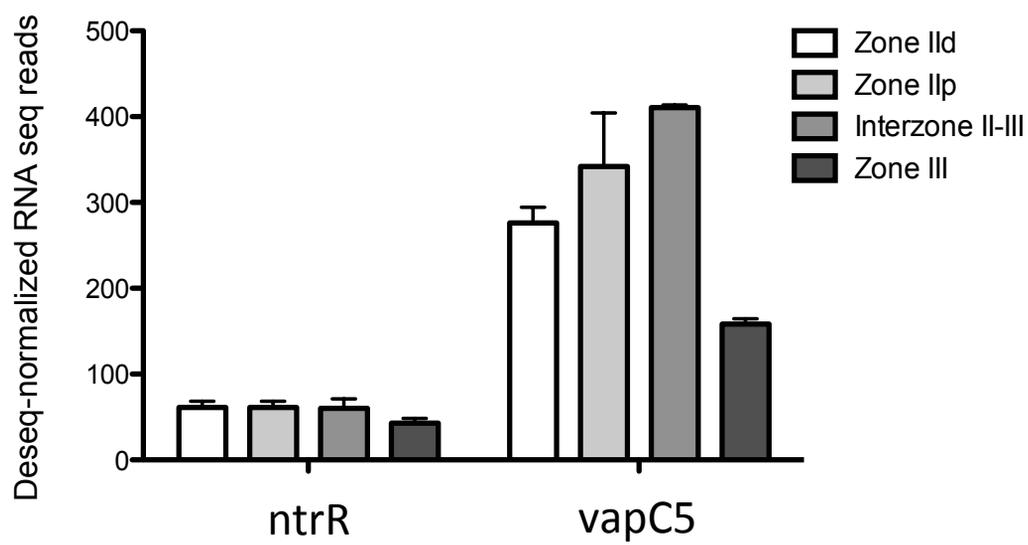


Figure S1



vapC7 gene is maximally expressed inside the nitrogen fixation zone III of the nodule, compared to other *vapBC* operons.

The *vapBC7* genes, located on the *S. meliloti* chromosome, are organized in operon with the antitoxin gene *vapB7* (SMc04408) preceding and overlapping the toxin gene *vapC7* (SMc04881) (Figure 1A), as it is usually the case for genes encoding type II TA systems. As deduced from the deep sequencing data of *S. meliloti* 2011 transcripts (Sallet et al., 2013), these genes are co-transcribed in a same mRNA, independently of the genes SMc04409, encoding a hypothetical protein, and SMc07226, specifying a novel ncRNA of unknown function. When *S. meliloti* was grown in free living conditions, the *vapBC7* expression was shown to be stimulated by 7-fold in early stationary phase compared to the mid-log phase (Sallet et al., 2013). Concerning the expression of these genes during symbiotic interaction, the situation is more complex due to the nodule structure complexity. Indeed, the indeterminate-type nodules induced by *S. meliloti*, formed from an apical meristem, exhibit different zones, which correspond to successive developmental stages of both partners. Using laser capture micro-dissection coupled to RNA-seq, the transcriptome of these specific nodule zones has been realized on young nodules harvested 15 days post-inoculation (dpi) (Roux et al., 2014). Interestingly, these data showed that the *vapC7* gene was expressed during symbiosis interaction and that its expression is 5 fold higher in the nitrogen fixation zone III, where bacteria are differentiated in fixing bacteroids, compared to the infection zone II where bacteria are released in plant infected cells and start their differentiation process (Figure 1B). This gene has thus a particular expression profile compared to the previously characterized *ntrR* and *vapC5* genes, for which expression is rather unchanged and low (*ntrR*) or down-regulated (*vapC5*) between zone II and zone III (Figure S1).

The *vapB7* gene encodes a protein of 9.9 kDa with an AbrB-like domain characteristic of repressors of the AbrB family that shares about 40% identity with the VapB5 antitoxin of *S. meliloti* (Lipuma et al., 2014) and with VapB proteins of pathogenic bacteria like VapB1 of

Figure S2

	1	10	20	30	40	50				
VapB2Rickettsia	.MNKAKI	FMNGQ	SQAVRLPK	EFRF	.SVKEV	SVIPLGKGI	VLQ	.PLNSWKDV...	FQE	
SMc00686VapB5	.MASSTV	FISNRS	SQAVRLPK	AFAF	PEGVHQV	DI	LKIGRSR	VIV	.PQGRWDDL...	FLS
VapBSalmonella	.MHTT	EFNRT	QAVRLPK	SISF	PEDVKH	VEI	IAVGRSR	IIT	.PVGESWDSW...	F.D
VapBShigella	.METT	VFLSNRS	SQAVRLPK	KAVAL	PENVKR	VEV	IAVGRTR	IIT	.PAGETWDEW...	F.D
SMc04408VapB7	MPHLAR	VFQSGNS	SQAVRLPK	EFRF	.NVDR	VEITQ	GDAL	ILR	.PHVEQGEQWSSLKAA	
VapB1Haemophilus	.MLTKV	VFQSGNS	SQAVRLP	MDFR	.DVD	VEI	FRKENG	VDVLR	PVSKKTD	DF...LAL

	60	70	
VapB2Rickettsia	MAEISSD	DI...PEGRKDLPP	QKRKYFE...
SMc00686VapB5	GPRVSED	...F...MSERD	QPVAETRESF....
VapBSalmonella	GEGASTD	...F...MSTRE	QPAVQEREGF....
VapBShigella	GHSVSTD	...F...MDNRE	QPGMERESF....
SMc04408VapB7	ARGMSED	...FM...MCGRE	QPEQDRSELDAVFR
VapB1Haemophilus	FEGFDET	...FIQALEARD	DLPPQERENL....

Haemophilus influenzae (Daines et al., 2007), VapB2 of *Rickettsia felis* (Audoly et al., 2011), VapB of *Shigella flexneri* (Dienemann et al., 2011) and VapB_{LT2} of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhimurium* str. LT2 ((Winther and Gerdes, 2011) (Figure S2). No significant homology could be detected between VapB7 and the *S. meliloti* NtrP antitoxin (Bodogai et al., 2006).

The *vapC7* gene encodes a putative PIN (PilT N-terminal) domain toxin of 14.5 kDa with 35% identity with the two characterized VapC of *S. meliloti* (VapC5 (Lipuma et al., 2014) and NtrR (Bodogai et al., 2006), 42% with the VapC_{LT2} of *Salmonella typhimurium* (Bodogai et al., 2006) and 28% with VapC1 of *Haemophilus influenzae* (Bodogai et al., 2006) (Figure 2A).

To demonstrate that the VapBC7 proteins act as a functional TA module, the two cognate proteins were expressed in *E. coli* under the control of the P_{BAD} promoter and viability was measured after arabinose induction (Figure 1C). The expression of the antitoxin alone or together with the toxin has no incidence on cell viability while the presence of VapC7 toxin has a toxic effect on *E. coli* cells survival. This shows that the two proteins are fully active and act as a TA system.

***S. meliloti* VapC7 acts as a ribonuclease**

VapC toxins activity has been functionally characterized in only few cases (Daines et al., 2007; Miallau et al., 2009; Ahidjo et al., 2011; Audoly et al., 2011; McKenzie et al., 2012; Lopes et al., 2014). However, it has been demonstrated that these VapC proteins act as ribonucleases in agreement with their PIN domain structure Alignment of *S. meliloti* VapC7 with multiple VapC toxins (Figure 2A) shows, at the expected positions, three highly conserved acidic residues assumed to form a catalytic site required for ribonuclease activity. Moreover, the predicted three-dimensional structure of *S. meliloti* VapC7 (Figure 2B) is comparable to that of the

Figure 3

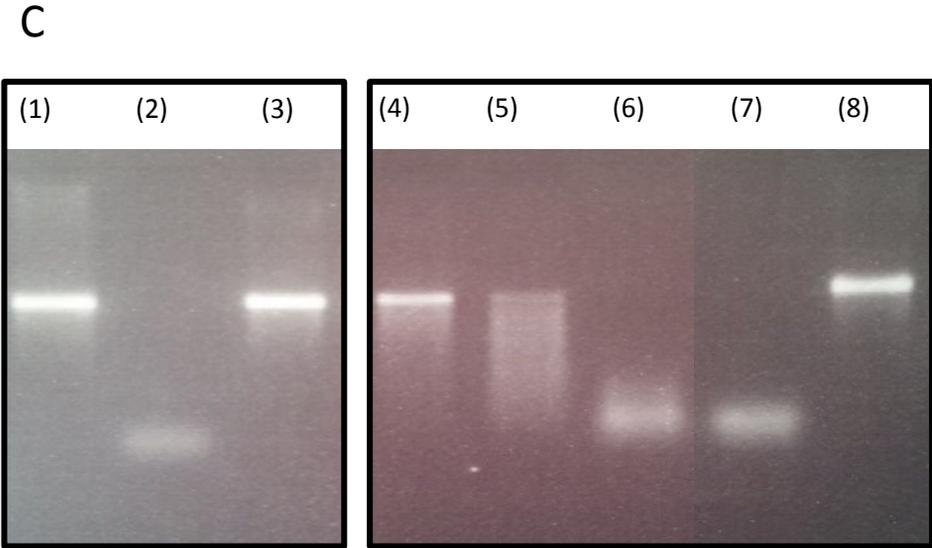
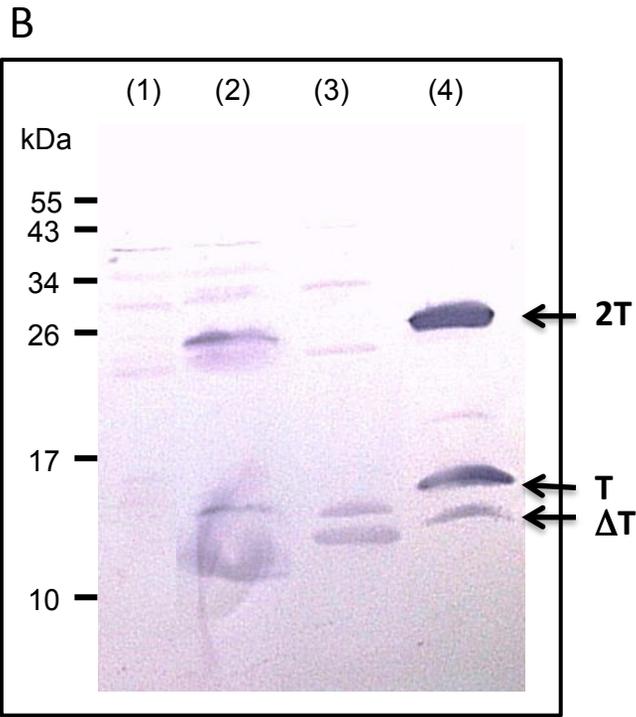
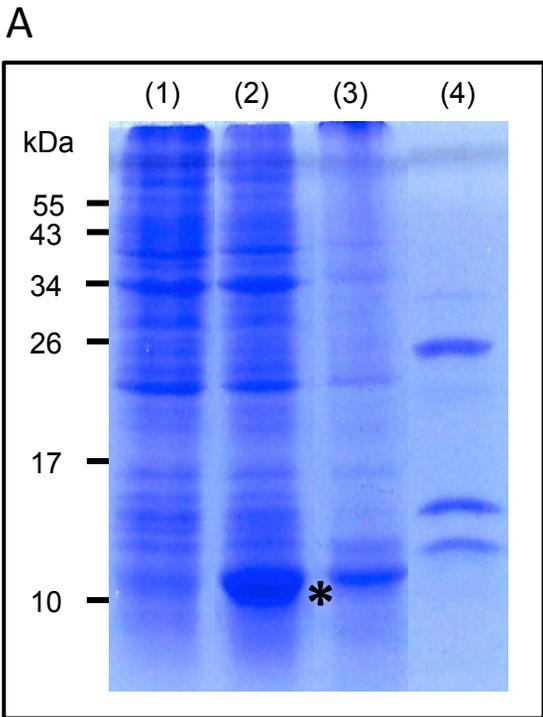
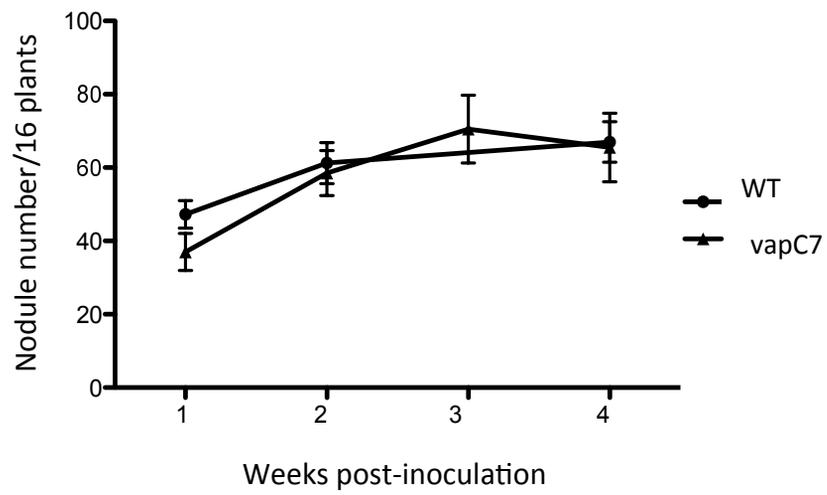


Figure S3



crystallized protein VapC protein of *Shigella flexneri* (Dienemann et al., 2011) which consists in a compact α -sheets and β -helices fold with an hydrophobic pocket defined by the three conserved acidic residues of the catalytic site. In order to demonstrate the ribonuclease activity of the *S. meliloti* VapC7 toxin, we expressed the whole *vapBC7* operon in *Escherichia coli*, as the overexpression of the toxin gene alone is toxic for *E. coli*. The purified recombinant C-terminal polyhistidine-VapC7 with the expected molecular mass (~15.3 kDa) can be visualized on Coomassie-stained SDS-PAGE gel (Figure 3A, lane 4) and corresponding Western blot using the antiHis-Tag antibodies (Figure 3B, lane 4). Moreover, an upper molecular mass signal (~30 kDa) was also observed on the immunoblot, which could correspond to a dimer of VapC7-His₆, and so, even if the electrophoresis was realized under denaturing conditions. This capacity of VapBC proteins to form multimers even during SDS-PAGE has been reported elsewhere (Daines et al., 2007; Lopes et al., 2014). In the purified fraction, a protein of ~12 kDa that reacts with antiHis-Tag antibodies was also detected. *In situ* purification and micro-sequencing of this protein showed that it represents a N-truncated form of the VapC7-His₆ protein (data not shown). As the toxin is co-expressed with its cognate antitoxin, the VapB7 antitoxin was also visualized (Figure 3A, lane 2) in the induced crude extract (~10 kDa) but was not detected in the VapC7 elution fraction.

The VapC7 ribonuclease activity was estimated by the ability of purified VapC7-His₆ to promote phage MS2 RNA degradation *in vitro*. While no RNA degradation was observed when incubated with the elution buffer alone (Figure 3C, lane 1), MS2 RNA degradation, in a quantity-dependent manner, was observed in presence of the purified VapC7 (Figure 3C, lanes 4, 5, 6). The total degradation of MS2 RNA (1.4 pmol), equivalent to that obtained with the positive control (0.146 pmol RNase A, Figure 3C, lane 2), was obtained with 13 pmol of purified VapC7. Consistent with enzymatic degradation, heat denaturation (20 min 100°C) of VapC7 (or RNase A) before the incubation assay, inhibits MS2 RNA degradation (Figure 3C,

Figure 4

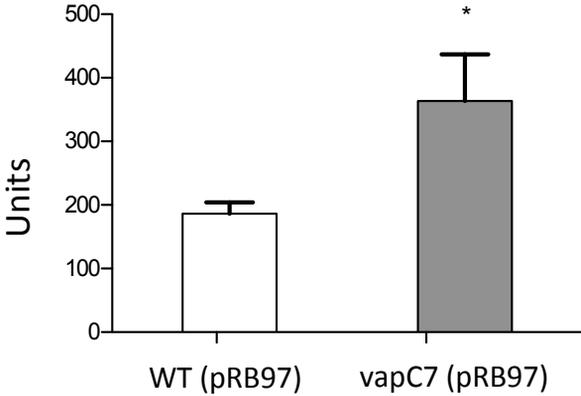
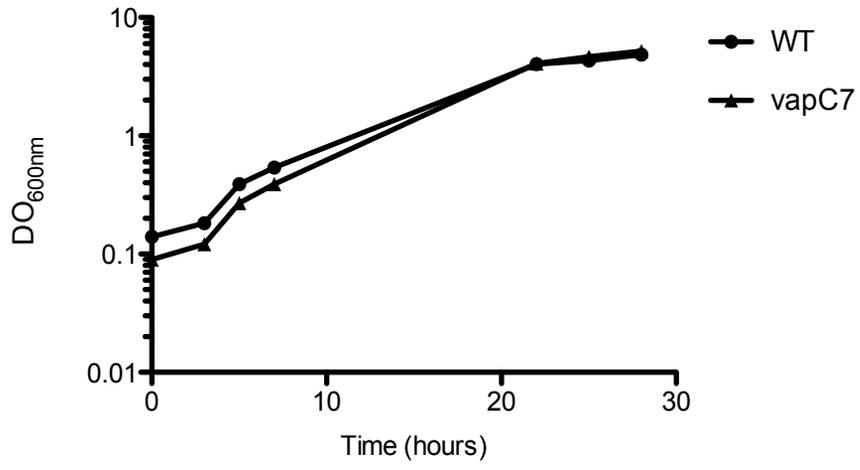


Figure S4



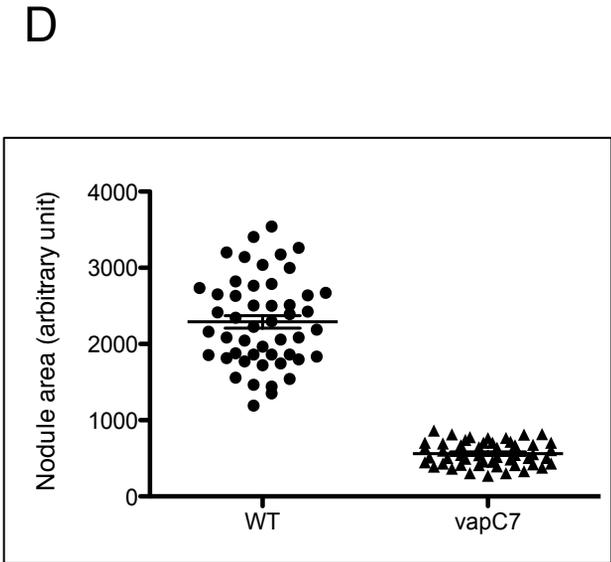
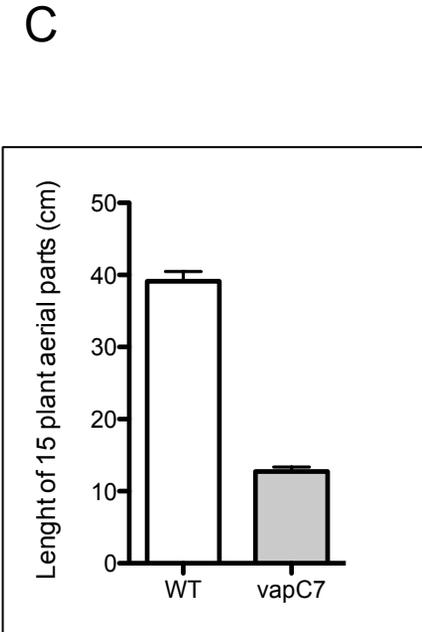
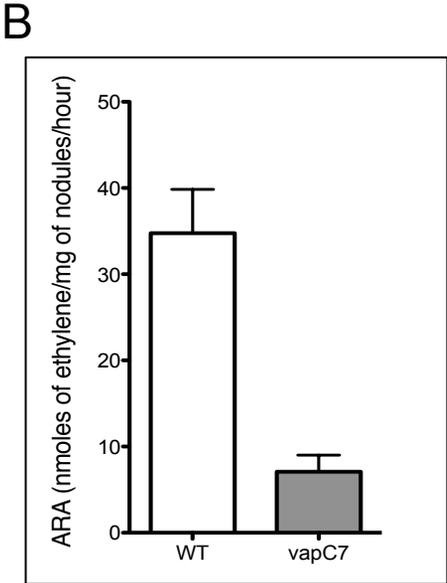
lanes 8 and 3, respectively). These results demonstrate that *S. meliloti* VapC7 toxin acts as an RNase.

Autoregulation of the *vapBC7* operon

A *S. meliloti* mutant (UNA404) invalidated in the *vapC7* gene was available in the mini-Tn5 library of mutants of *S. meliloti* constructed in the 2011 genetic background (Pobigaylo et al., 2006). The 3275 nt sequence of the mini-Tn5 insertion was precisely localized at the 5' end of the *vapC7* gene, between the nucleotides 150 and 151, leading to a truncated protein of 38 amino acid residues upon 134 for the full length protein (Figure 1A).

It is well known that the TA products themselves tightly negatively control the expression of their TA operons (Gerdes et al., 2005). The promoter activity of the *vapBC7* operon was thus followed in a wild type and *vapC7* mutant genetic background (strains 2011 and UNA404, respectively, Table S1). For this purpose, the *vapBC7* promoter was fused to the *lacZ* reporter gene carried by the replicative plasmid pEP82 resulting plasmid pRB97. In the *vapC7* mutant, the promoter activity was 2-fold higher compared to that detected in the WT strain (Figure 4). These results demonstrate that the toxin negatively controls the expression of the *vapBC7* operon. However, knowing that only the antitoxin has a DNA binding domain, the toxin more probably acts as a co-repressor of the antitoxin in a TA complex responsible of the repressor effect on *PvapC7* transcription.

Figure 5



A VapC7 deficient mutant induces early nodule senescence during *Medicago truncatula* symbiosis

Plant yield and nitrogen fixation efficiency of the *vapC7* mutant

The symbiotic properties (nitrogen fixing capacity and plant yield) of the WT and *vapC7* mutant strains were studied in interaction with *Medicago truncatula* six weeks post-inoculation (6 wpi) (Figure 5). Plants inoculated with the mutant strain were dramatically affected in their growth (Figure 5A) leading to a plant length of aerial parts reduced by 70% compared to that observed for plants inoculated with the wild type strain (Figure 5B). In agreement, the nitrogen fixation efficiency, measured by the plant root nodules capacity to reduce acetylene, showed that the *vapC7* mutant was significantly and reproducibly 80% less efficient than the WT strain in its ability to fix nitrogen (Figure 5C).

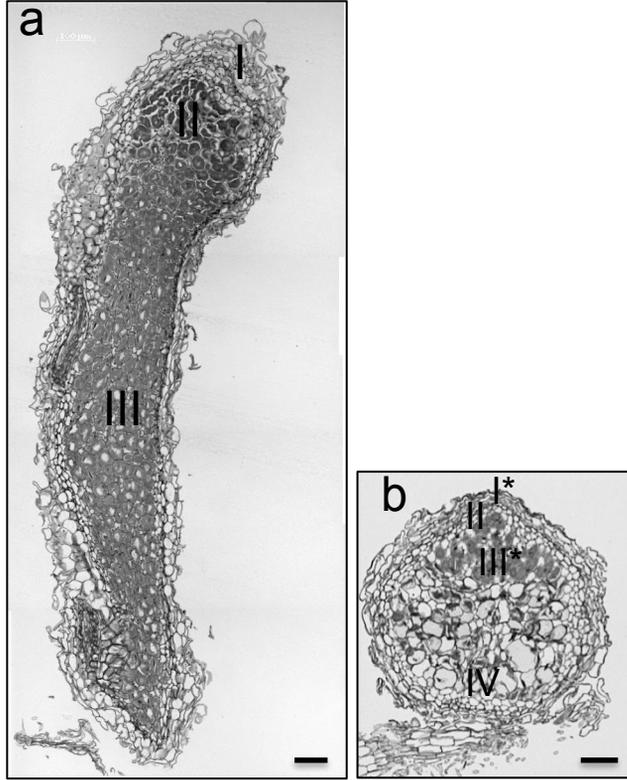
This original phenotype constitutes the first example for which the toxin invalidation of a TA system of a plant interacting bacteria negatively affects the symbiotic interaction. Indeed, the two examples of *vapC* mutations described so far in *S. meliloti* showed a completely opposite phenotype, i.e. an increased nitrogen fixation efficiency and improved plant yield (Bodogai et al., 2006; Lipuma et al., 2014).

VapC7 deficient mutant induces early senescent nodules

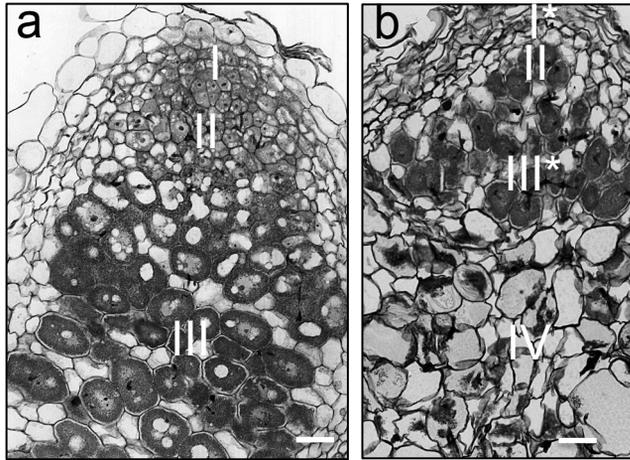
To know if the *vapC7* mutation impacts the nodulation capacity of bacteria, a kinetic of nodulation was realized with the WT and *vapC7* mutant strains, in interaction with *M. truncatula* plantlets. No difference in the aptitude to induce root-nodules, neither in the kinetic of their formation nor the number of nodules generated, was observed between the two strains (Figure S3), suggesting that the first steps of infection was not impaired in the VapC7 toxin deficient strain. The mutant strain neither present a lethal phenotype in free living conditions

Figure 6

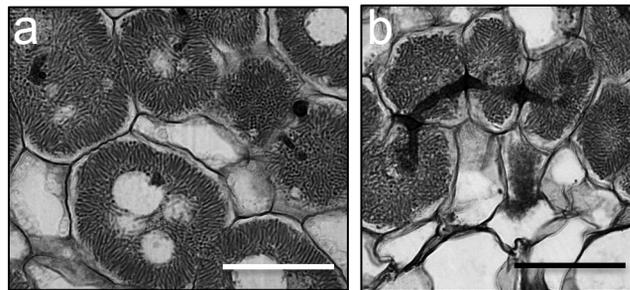
A



B



C



WT

vapC7

which could explain the symbiotic phenotype, knowing that its growth capacity in a rich medium was similar to that of the wild type 2011 strain (Figure S4).

To better understand the altered nitrogen fixation phenotype induced by *vapC7* mutant in symbiosis with *M. truncatula*, the ultrastructure of the mature nodule (6 wpi) was examined by optic microscopy on thin nodule sections stained with Toluidine blue. The results showed that the *vapC7* mutant strain produces abnormal small (Figure 5D) and round shape nodules (Figure 6b) compared to the WT-induced mature nodules of typical oval shape (Figure 6a). Compared to the WT nodules, where a merismatic zone I, responsible of the nodule elongation, was clearly observed (Figure 6c), this zone was really thin or inexistent in *vapC7* nodules (Figure 6d). Moreover, the infection (II) and nitrogen fixation (III) zones were also really compacted compared to the corresponding zones in the WT nodules and preceded a premature senescent zone IV not observed in WT nodules. A comparison of the plant infected cells (Figure 6e-f) showed, in both cases, the presence of elongated bacteroids suggesting that *vapC7* bacteria differentiation took place. However, in this zone III, the infected plant cell enlargement in *vapC7* nodules was reduced compared to WT nodules. The predominant zone of the mutant nodule has senescent zone IV characteristics with the presence of empty plant cells devoid of bacteroids. In this early senescent zone, many infection threads were observed that are probably the consequences of continuous reinfection due to the less efficient nitrogen fixation and plant demand, or more probably to saprophytic infection due to cell degradation and nutrient leakage of the senescent cells, as described in the saprophytic zone V (Timmers et al., 2000).

Thus, the reduced nitrogen fixation phenotype ($\text{Fix}^{+/-}$) obtained with the *S. meliloti* strain deficient in the VapC7 toxin is associated to an early nodule senescence phenotype.

To formerly demonstrate that the *vapC7*-induced nodules were early senescent, quantitative RT-PCR (RT-qPCR) experiments were realized on RNA extracted from WT and *vapC7* young

nodules that do not show sign of senescence in a WT type nodule context (three weeks post-inoculation). For this purpose, genetic markers specific from the nitrogen fixing zone III (Leg and NCR001) and from the senescent zone IV (CP3, CP6 and VPE) were used. The *leg* gene encodes the nodule O₂-binding leghemoglobin protein, crucial for nitrogen fixation efficiency (Ott et al., 2005), which contributes to maintain the microaerobic environment within the infected zone of the nodules (Minchin, 1997) and to protect the oxygen sensitive nitrogenase from degradation. The *NCR001* gene marker expresses a nodule cysteine rich peptide (Mergaert et al., 2003). Our results showed that only the Leg expression was statistically reduced in mutant nodules compared to WT nodules (Figure 7). Among the three senescent protease markers encoding either cysteine proteases (CP3 and CP6) or vacuolar processing enzyme (VPE), all shown to be specifically induced in the senescent zone (Van de Velde et al., 2006; Pérez et al., 2010), the expression of two of them (CP3 and CP6) was enhanced by a 3-fold factor in *vapC7* nodules compared to WT nodules (Figure 7).

Taken together, these results demonstrate, at the molecular level, that *vapC7* mutant induces an early nodule senescence process when in interaction with *M. truncatula*. This suggests a major role for this VapBC7 module of *S. meliloti* during symbiosis.

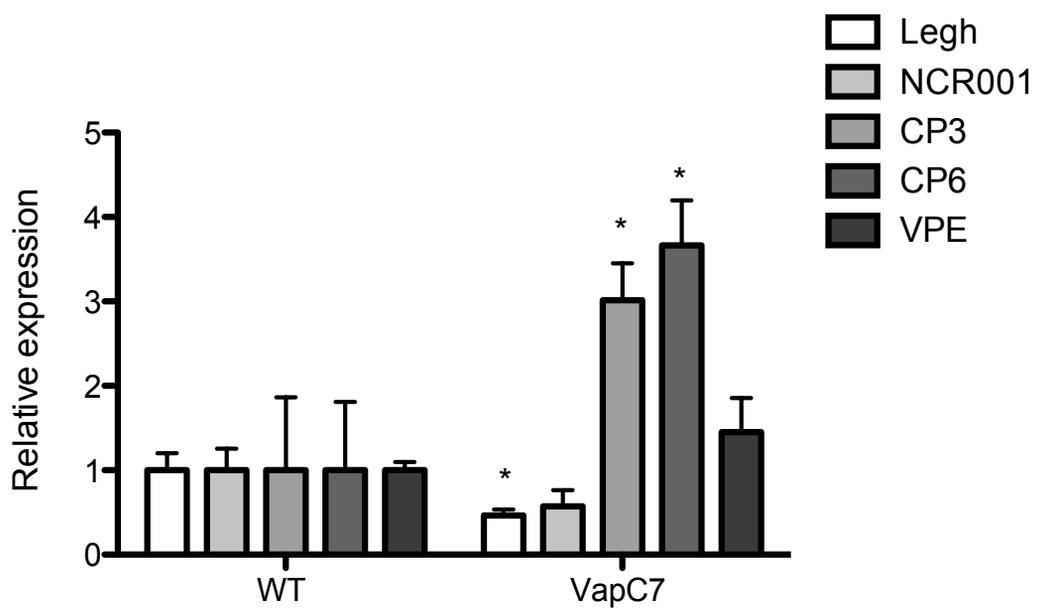
***vapC7* bacteroid differentiation efficiency and viability are affected in *Medicago truncatula* root nodules**

Nodule cell differentiation is partly impaired in *vapC7* nodules

To precise the link between the *vapC7* toxin gene mutation of a TA module on the early nodule senescence phenotype, we raised the question of the degree of differentiation of both symbiotic partner cells.

Indeed, infection threads allow the release of bacteria in the cytoplasm of sub-meristematic cells in the infection zone II, by endocytosis process. Bacteria entrapped in a membrane of cell origin

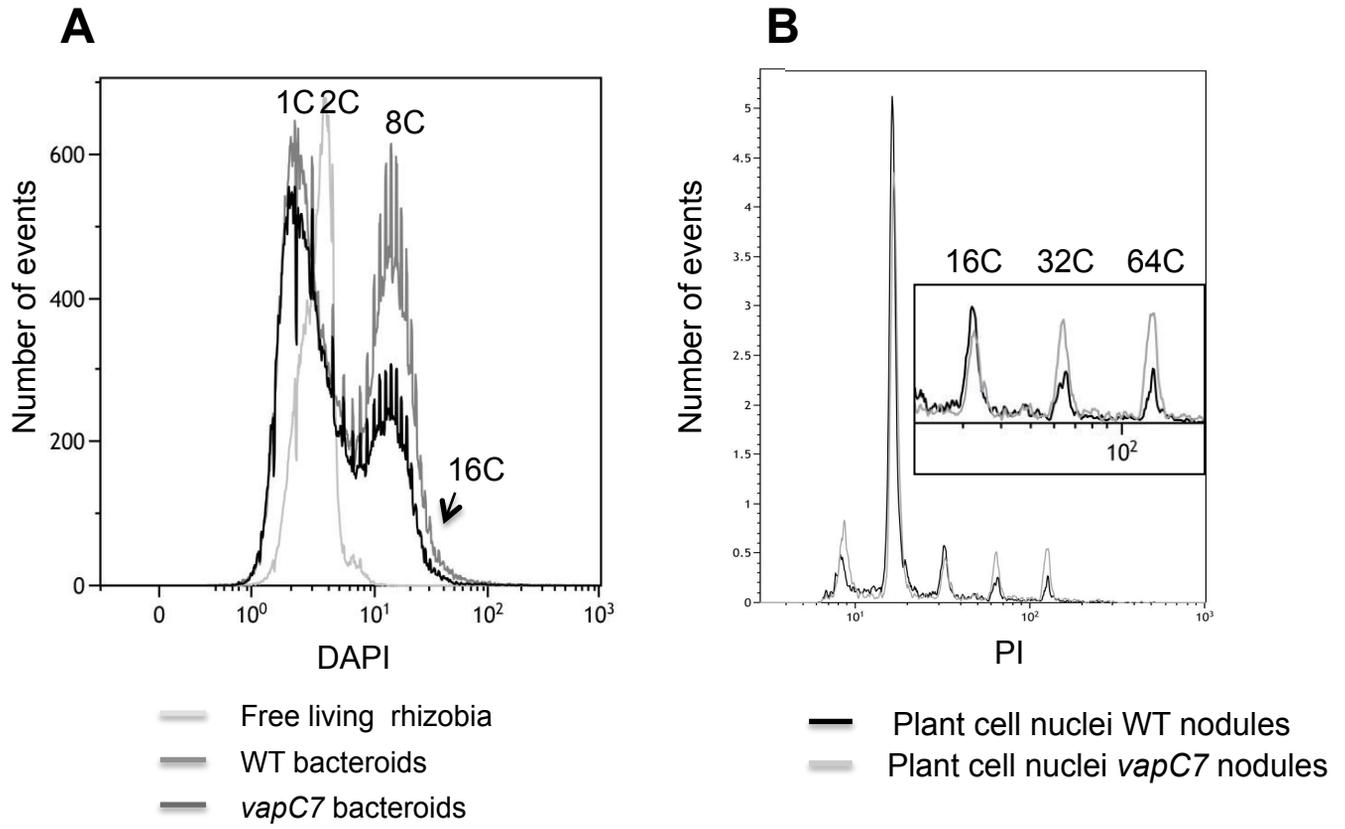
Figure 7



are then called “bacteroids” and the whole organelle-like structure entity is called the “symbiosome”. In the infected organ, both plant and bacteroid cells progressively differentiate along the different cell layers of the infection zone II to become fully differentiated at the beginning of zone III (Mergaert et al., 2006). Due to endoreduplication of their genome, symbiotic plant cells are polyploids (genome replication without mitosis and cytokinesis) resulting in 64C or 128C nodule cells (C being the haploid DNA content) (Vinardell et al., 2003; Gonzalez-Sama et al., 2006). This results in plant larger cell size, mainly responsible for the growth of the nodule, and which allows the cells to host thousands of bacteroids/symbiosomes. The bacteroid cell maturation is also associated to endoreduplication of its genome until 24C (Mergaert et al., 2006), associated to bacterial cell enlargement and elongation from 1-2 μm (size of free living cells) to 5-10 μm (size of differentiated fixing bacteroids) usually combined with a Y-shape of the bacteroid cells.

To determine if symbiotic nodule cells in WT and *vapC7* induced nodules could differentiate, *S. meliloti* bacteroids and nuclei from *M. truncatula* cells, were isolated from 3-wpi old nodules; stained with the fluorescent DNA dye 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) for *S. meliloti* bacterial cells or with the DNA stain propidium iodide (PI) for isolated nuclei, and analyzed for their DNA content by flow cytometry (Figure 8A,B). Compared to the DNA content of free-living bacteria in exponential phase of growth (peak 2C), WT and *vapC7* bacteroids DNA content peak at 8C while a 16C genome endoreduplication could also be detected (Figure 8A). In both nodules types, the 1C peak observed corresponds to the non-differentiated bacteria population coming from infection threads and contaminating the bacteroid preparation. While *vapC7* genome endoreduplication occurred, 25% less rhizobia differentiate in bacteroids in the infected cells of mutant nodules compared to the WT situation (Table S3). This suggests that the *vapBC7* module contributes to the bacteroid differentiation efficiency.

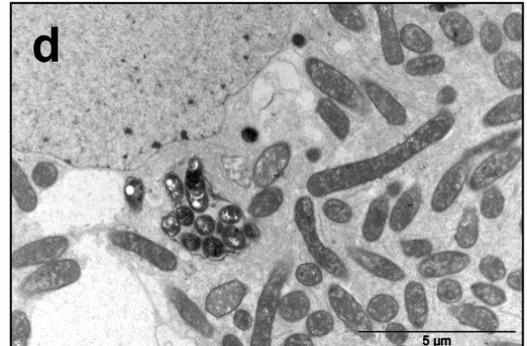
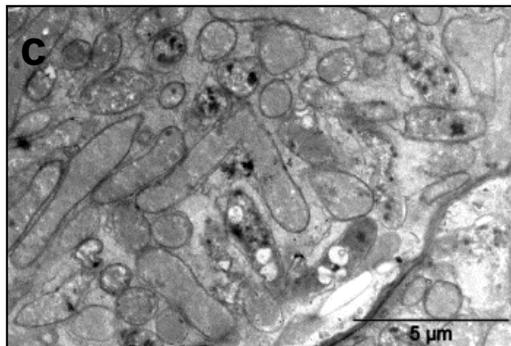
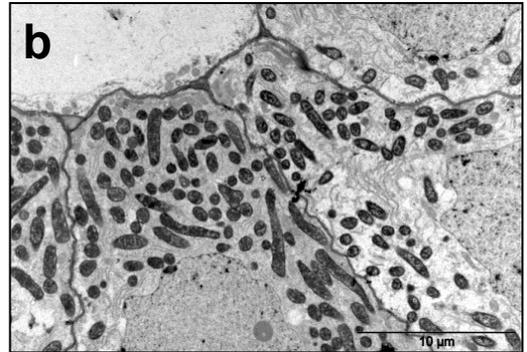
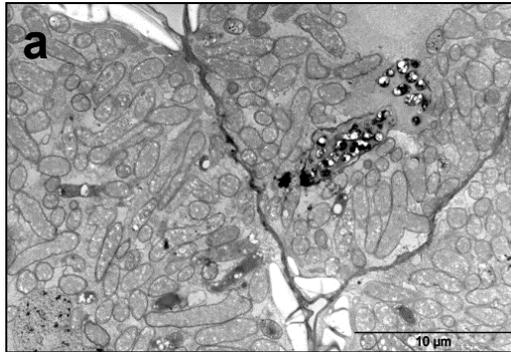
Figure 8



C

WT 2011

vapC7



In agreement with these results, electron microscopy analysis, realized on three wpi young nodules, confirmed that, in the fixation zone III, less *vapC7* enlarged bacteroids inside infected plant cells were present (Figure 8Ca-b) and that no Y-shaped *vapC7* bacteroids could be observed compared to WT bacteroids (Figure 8Cc-d).

***vapC7* bacteroids are submitted to rapid cell death**

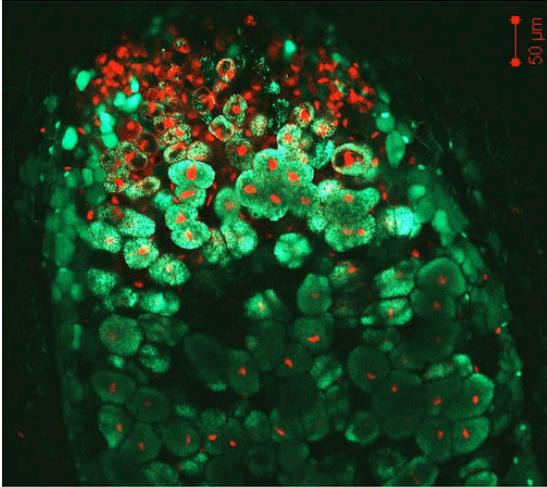
The impact of the *vapC7* mutation on the viability of differentiated bacteroids was examined *in vivo* by confocal microscopic analysis on nodule sections pre-incubated with the Live/Dead®BacLight™ probe (Invitrogen) as described previously (Haag et al., 2011). Briefly, Live/Dead staining is composed of two fluorescent DNA intercalating agents: SYTO9 (green fluorescence) stains living cells and PI (red fluorescence) stains dying cells with altered membrane permeability. Our results (Figure 9) showed that WT bacteroids fluoresced green in the infection zone II and in the whole fixing zone III in agreement with their viability. While viable *vapC7*, bacteroids, green labelled by SYTO9 rapidly became PI red stained as soon as they differentiate in the beginning of the fixation zone III. This leads to a zone III* where bacteroids are still present but are not nitrogen fixing because of their cellular death.

The NADPH oxidase RBOHF may contribute to the bacteroid eviction in the *vapC7* deficient nodules

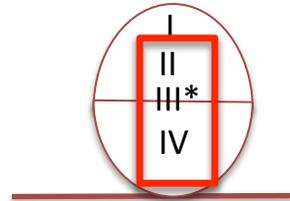
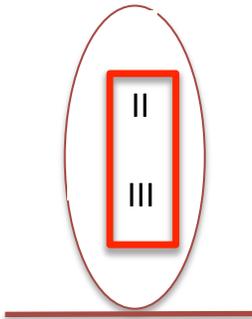
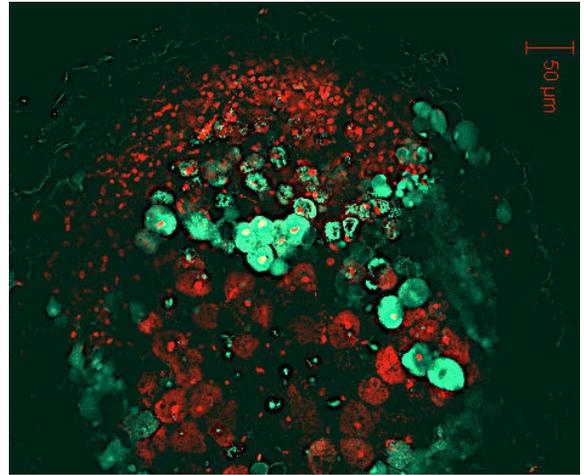
One of the common plant responses to pathogen infection is the hypersensitive response (HR), which is characterized by a Reactive Oxygen Species (ROS)-dependent oxidative burst (Nanda et al., 2010). The strongly effect observed on *vapC7* bacteroid cell death (Figure 9) raises the question of the involvement of ROS in the early nodule senescence process observed.

Figure 9

WT



vapC7

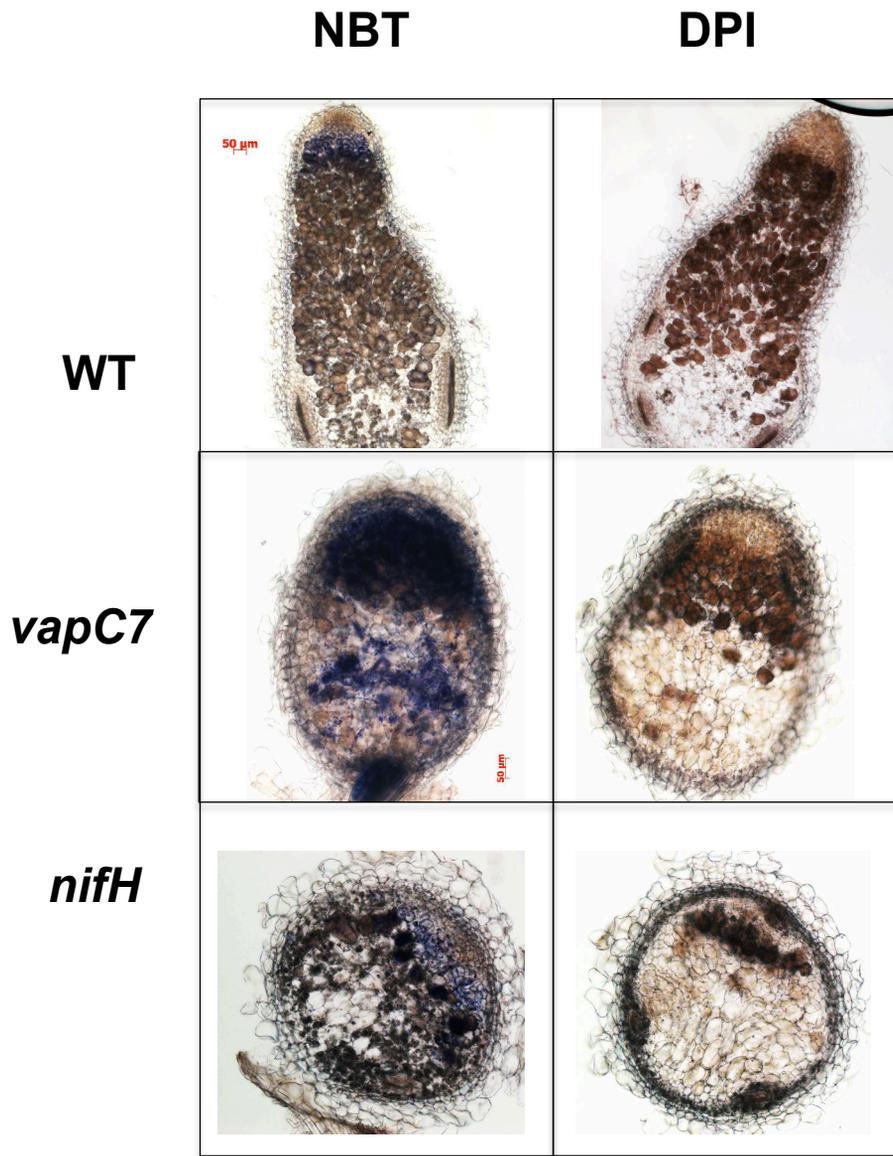


For this purpose, a nitro blue tetrazolium (NBT) staining of root nodules has been performed in order to detect anion superoxide (O_2^-). In our conditions, while a clear NBT staining was observed in the infection zone of WT nodules, a strong and large staining was observed in *vapC7* nodules (Figure 10A), suggesting a strong increase of O_2^- in the infection and fixation zones. A NBT staining could also be observed in the empty cells of the senescent zone IV, which could be explained by the reinfection of saprophytic bacteria. Similar experiments were performed with nodules from *nifH* mutant inoculated plants. *S. meliloti nifH* mutants are known to form Fix^- nodules and are described as being early senescent (Hirsch et al., 1983). This mutant was retained because it presents, in interaction with *M. truncatula*, comparable characteristics shared by the *vapC7* mutant. Indeed, in *nifH* induced nodules, symbiotic cells are formed and are infected with differentiated bacteroids but symbiotic cells undergo senescence prematurely because of the absence of effective nitrogen fixation (Maunoury et al., 2010). Even if the *nifH* root nodules were smaller than the WT ones, a NBT staining was clearly observed in infection zone II, similarly to the staining detected in WT nodules but different from the *vapC7* nodules (Figure 10A). These results show that the presence of the VapC7 toxin deficient mutant is linked to an oxidative burst whatever the zones of the nodules concerned (zones II, III, III*, V (saprophytic)) and that this burst signature is specific to *vapC7* mutant.

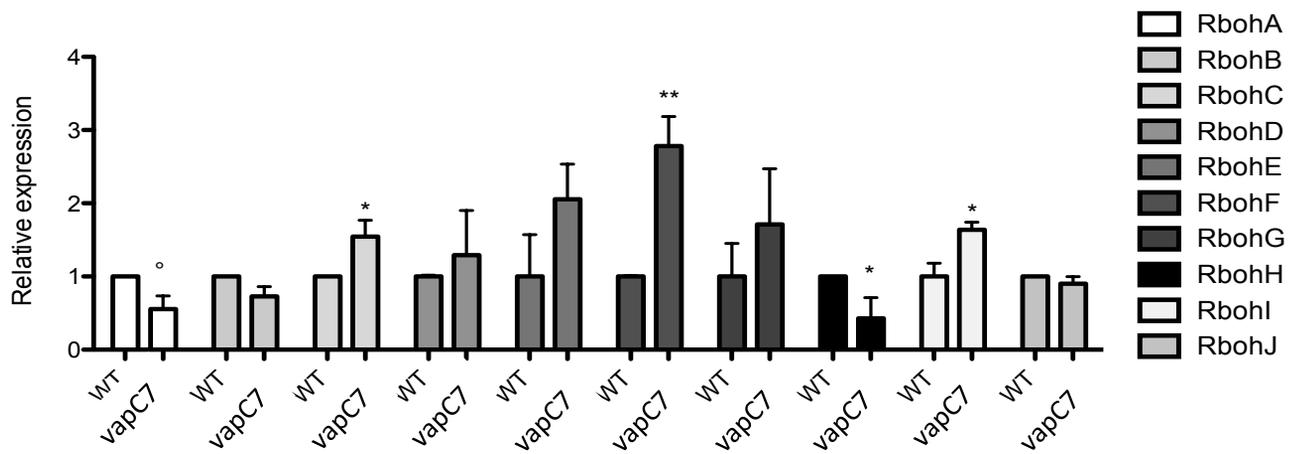
A DPI pre-treatment (a commonly used NADPH oxidase inhibitor) was able to suppress the NBT staining (Figure 10A), strongly suggesting the involvement of NADPH oxidases (also named Respiratory Burst Oxidase Homologs-RBOHs- in plants). As RBOHs have recently been described as playing a role in rhizobial symbiosis (Marino et al., 2011; Montiel et al., 2012), we evaluated the expression of the ten *M. truncatula Rboh* encoding genes in WT and *vapC7* nodules (Figure 10B). The expression of five *MtRbohs* genes were not significantly modulated in our experiments, such as *MtRbohB* with is constitutively expressed in *M. truncatula* (Marino et al., 2011). A two-fold decrease of *MtRbohA* and *MtRbohH* gene expression was observed in

Figure 10

A



B



vapC7 nodules. This is in line with previous results indicating the importance of *MtRbohA* in nodule functioning (Marino et al., 2011). Interestingly, a 3-fold increase of *MtRbohF* was observed in *vapC7* nodules (Figure 10B). *MtRbohF* gene was previously shown to be mainly expressed in roots and root hairs, suggesting a putative role in *M. truncatula* root hair development (Marino et al., 2011).

Altogether, these results clearly suggest that the oxidative burst observed in *vapC7* nodules seems to be mainly associated to an overexpression of RBOHF that could play a role in the eviction of the early senescent bacterial mutant.

Materials and Methods

Biological material

Plant growth conditions

Plants were inoculated and grown in pots containing 2/3 vermiculite and 1/3 sand in controlled-environment (phytotron using 16h light/ 8h dark photoperiod at 23°C). Plants were harvested at 3 or 6 weeks-post inoculation, as mentioned. For RNA extraction, nodules were stored at -80°C or processed immediately after harvest for microscopy study.

Bacterial growth conditions

The strains used in this study are listed in TableS1. *Escherichia coli* strains were grown at 37°C in Luria–Bertani (LB) medium, and *S. meliloti* strains were grown at 30°C in LB medium supplemented with 2.5 mM MgSO₄ and 2.5 mM CaCl₂ (LB_{MC}). Antibiotics for the selection of *E. coli* strains were used at the indicated concentrations: ampicillin, 100 µg ml⁻¹; chloramphenicol, 10 µg ml⁻¹; streptomycin, 100 µg ml⁻¹; tetracycline, 10 µg ml⁻¹. For the selection of *S. meliloti* strains, antibiotics were used at the indicated concentrations: streptomycin, 200 µg ml⁻¹; neomycin, 200 µg ml⁻¹; tetracycline, 20 µg ml⁻¹.

Construction of plasmids

pGC101: Using AT2antit1 5'-ATGCCCCATCTTGCACGGGTG-3' and AT2antit2 5'-ACCGAAATACGCGTCCGAGTTTCC-3' primer pair, a 259 bp fragment was amplified by PCR which carried the vapB-7 antitoxin gene. This fragment was cloned in the EcoRV site of pBluescript and resulted in the plasmid pGC98. The 294 bp SmaI/SalI fragment of this construct

was cloned in the SmaI/SalI site of pBAD24, fused downstream to the arabinose inducible promoter.

pGC165: Using AT2t1 5'-CCATGGTGATCTCCCATATTCTC-3' and AT2t2 5'-CTAGAGCGACCAATCCTCCACG-3' primer pair a 410 bp fragment was amplified, which carried the vapC-7 toxin gene. This fragment was cloned in the EcoRV site of pBluescript obtaining plasmid pGC99. From this construct a 417 bp NotI/HindIII fragment was isolated and cloned in the NcoI/HindIII site of pBAD24 vector, hence getting the vapC-7 toxin gene fused to the arabinose inducible promoter.

pGC107: The AT2 antit1 and AT2t2 primer pair was used to amplify a 662 bp fragment carrying the vapBC-7 TA module. This fragment was cloned in the EcoRV site of pBluescript obtaining plasmid pGC100. 703 bp SmaI/SalI fragment of this construct was inserted in the SmaI/SalI site of pBAD24, resulting in the fusion of the arabinose inducible promoter to the vapBC-7 coding genes.

For construction of a promoter::lacZ fusion, the promoter region of vapBC-7 was amplified by PCR reaction using AT2prom1 5'-TCATGAAGTCTTCACTCATGCCAC-3' and AT2prom2 5'-TTCGGATCCGCGATGATGTTCTTC-3' primer pair. The obtained 997 bp fragment was cloned in the EcoRV site of pBluescript resulting in the plasmid pRB93. The 1020 bp HindIII/PstI fragment with the promoter region was isolated from this construct and cloned in the HindIII/PstI site of pEP82. The obtained promoter::lacZ transcriptional fusion vector pRB97 was used for the detection of vapBC-7 promoter activity.

Viability tests and β -galactosidase measurements

Viability tests were done as described by Bodogai et al. (Bodogai et al., 2006) β -galactosidase measurements from cultures of free-living bacteria and plant nodules were carried out as described previously (Olah et al., 2001).

Nitrogen fixing efficiency and plant yield

Nitrogenase activity was determined by the acetylene reduction assay. Fifteen plants were sacrificed for each condition, and each time point. All the experiments were realized in three biological replicates. N_2 fixation activity was determined by assessing C_2H_2 reduction by gas chromatography, as previously described (Hérouart et al., 1996).

Plant length measurement and weight were realized on aerial parts. Fifty plants were used on three biological replicates.

Nodule Ultrastructure analysis

Ten nodules were collected at three and six week post-inoculation. Tecknovit protocol was used as follow. Nodules were fixed in 25% glutaraldehyde and 37% formaldehyde in phosphate buffer pH 7.2, during 30 min in a vacuum bell. After dehydration in ethanol, nodules were immersed in Tecknovit 7100 (Kulzer Histo-Technik, Heraeus France, Villebon, France)/ethanol 100% overnight at 4°C. Infiltration was done with tecknovit 7100 and hardened overnight at 4°C. Finally, nodules were included on Hardener II/Tecknovit 7100. Blocks were cut at 5 μ m with jung rotative microtome. Sections were then stained with blue toluidine and microscopically observed with a Zeiss Axioplan 1. This experiment was realized on 3 biological replicates.

Flux cytometry on bacteroids and plant nuclei

Twenty plants of *M. truncatula* were sacrificed at three weeks post-inoculation. Nodules were crushed on phosphate buffer 50mM. Two gentle centrifugations were realized, after filtration on gauze to collect bacteroids that were resuspended in PBS buffer containing DAPI (50 µg/ml). Ploidy analysis was realized on a flux cytometer at the IPMC platform.

For the ploidy analysis of plant nuclei, three nodules, roots or leaves were harvested on three plants for each time point. These tissues were chopped with razor blade in Galbraith Buffer (GALBRAITH et al., 1983). After filtration on gauze, nuclei were stained in Galbraith buffer containing Propidium Iodide (1mg/ml). Flux cytometry analyses were done on three biological replicates and one representative result is shown in this study.

Live Dead Staining

Three week-old nodules were harvested, embedded in 4% (W/V) agarose and prepared for Live/Dead staining as described (Cam et al., 2012). Nodule sections (80µm) were obtained with a vibratome and incubated for 30 min in Live/Dead staining solution (5mM Syto9, 30mM Propidium iodide, Live/Dead®BacLight™ probe (Invitrogen)). Nodule sections were removed from the staining solution and mounted in deionized water for microscopy observations. Images were acquired with a Zeiss confocal laser-scanning microscope (LSM510 META). This experiment was repeated 3 times.

RNA extraction and qPCR

100 mg of nodules were harvested and used for each experiment. Total RNA was extracted from nodules with trizol protocol. DNase treatment was done on total RNA before reverse transcription (TURBO DNase life technologie). cDNA were obtained with reverse transcription with TAKARA RT Kit and, according to the manufacturing protocol, 500 ng of RNA were used.

RT qPCR was performed with a DNA Engine Opticon 2 continuous Fluorescence Detection system (MJ Research, Bio-Rad, Marnes-la-coquette, France) and qPCR GO Taq (Promega). In each reaction, used 5 μ L of 100 fold-diluted cDNA and 0,3 μ M primers were used. The PCR conditions were 95°C for 10 min, followed by 39 cycles of 95°C 15 sec and 60°C for 1 min. Each reaction was performed in triplicate and the significance of differences was assessed with Student's *t*-test using R software.

Data were quantified with Opticon monitor 2 (MJ Research). Two constitutively expressed genes, Mtc27 and 40S for plant markers analysis were chosen with Genorm among five different genes, and used as referent genes for normalization.

Expression and purification of the VapC7 recombinant protein

Escherichia coli BL21(DE3)pLysS cells expressing the pET28A-Sm VapBC7 plasmid were grown to an A_{600} of 0,6 at 37°C in 200 mL of LB broth medium supplemented with 30 μ g/mL kanamycine and 34 μ g/mL chloramphenicol. The *vapBC7* expression was induced with 1 mM isopropyl- β -D-thiogalactoside for 3h at 37°C. Cells were then harvested by centrifugation and resuspended in 3.5 mL/g of pellet of 50 mM NaH_2PO_4 pH8, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, 5 mM β -mercaptoethanol, protease inhibitor mixture (Roche, Compleat Ultra tablets, mini, EDTA free) and 1 mg/mL lysozyme. After 20 min of incubation on ice, cell lysis was performed by sonication with a Vibra-cell disruptor (pulses every 3s on power setting 5). The crude extract was incubated 10 min on ice with DNase I (5 μ g/mL) and RNase A (10 μ g/mL) and centrifuged at 10 000g for 20 min at 4°C to yield a cell-free supernatant.

The soluble protein extract (4 mL) containing recombinant VapB7 and VapC7-His6 was added to 1mL HisPur Ni-NTA resin (ThermoScientific) and mixed by shaking 90 min at 4°C. Lysate-

resin mixture was then loaded into column and washed with 2 x 5 mL of 50 mM NaH₂PO₄ pH8, 300 mM NaCl, 50 mM imidazole, 5 mM β-mercaptoethanol. VapC7-His6 was eluted with 8x 0.5 mL of 50 mM NaH₂PO₄ pH8, 300 mM NaCl, 250 mM imidazole, 5 mM β-mercaptoethanol. Protein concentration was determined by Bradford method using Bio-Rad protein assay and BSA as standard. Purified protein was diluted to 0.2 µg. µL in 50 mM TrisHCl pH8, glycerol 40% to avoid protein precipitation.

Electrophoretic Analyses of proteins and immunoblotting

Proteins were separated on a 15% (w/v) polyacrylamide gel under denaturing conditions (SDS-PAGE, mini-protean system; Biorad) and stained with Coomassie brilliant blue R250 (Biorad) or electrophoretically transferred to nitrocellulose membranes (Whatmann) using a Mini trans-Blot electrophoretic transfer cell system (Biorad). Immunoblots were hybridized with rabbit anti-His antibody (GenScript, 1/8000), washed in TBS-T (TBS (10mM Tris pH8, 15 mM NaCl) with 0.1% Tween 20) and incubated with phosphatase alkaline conjugated anti rabbit IgG (Sigma, 1/5000). Immunoblots were detected using NBT-BCIP substrate (Sigma).

RNase activity assay

Purified VapC7 (5.2, 10.4, 13 or 52 pmol) was incubated with 1.4 pmol of MS2 RNA (Roche) in 30 µL final volume of Tris-HCl 50 mM pH8 for 30 min at 30°C. The reaction was stopped by addition of loading dye solution (Euromedex) and analyzed by 1.2% agarose gel electrophoresis.

Anion superoxide localization in nodule sections

O₂⁻ detection was done with nitroblue tetrazolium (NBT) staining (Sigma, www.sigmaaldrich.com). Plant roots were infiltrated with 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.8) under vacuum at room temperature for 90 min. They were then including in Agarose 4% and sections were done with vibratome. The sections were incubated with the staining solution (1 mM NBT, 10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.8) for 20 min at 37°C. The staining reaction was stopped by boiling the roots three times, for 10 min each, in absolute ethanol. Finally, NBT-stained samples were visualized with a Zeiss Axioplan 1 microscope. A negative control was done with diphenylene iodonium (DPI) staining (Andrio et al., 2013).

Electronic microscopy transmission (TEM)

Analysis of WT and vapC7 nodules (3 wpi) by electron microscopy was performed on the CCMA EM Core Facility (Université de Nice Sophia Antipolis) with 120 kV - JEOL JEM1400 (2009).

Figure legends

Figure 1. The VapBC7 module: Genetic organization, nodule expression and functionality

- A. Genetic organization of the *S. meliloti* *vapBC7* operon. The white arrow indicates the position of the mini-Tn5 insertion in the *vapC7* gene (strain UNA404).
- B. Nodule expression of *vapC7* toxin gene. The transcript accumulation of *vapC7* gene in the different zones of *S. meliloti* 2011 induced nodule was represented in normalized RPKM (<https://iant.toulouse.inra.fr/symbimics>) (Roux et al., 2014).
- C. Toxicity of the VapC7 protein in *E. coli* DH5 α .

Expression of the VapB7 antitoxin from plasmid pRB119 (black squares), expression of VapC7 toxin from plasmid pRB114 (black circle) and the simultaneous expression of VapB-7 and VapC-7 from plasmid pRB121 (white triangles) were induced by the addition of 1% arabinose to *E. coli* cultures at OD₆₀₀=0.4. Control cells carried the vector plasmid pBAD24 (white circles). Samples taken at 0, 7, 18 and 25 hours after induction, were diluted and plated on LB medium containing 100 μ g/ml ampicillin. Living cell numbers were calculated from data of four independent experiments. Bars represent standard deviations. Viability tests were done as described by Bodogai et al. (Bodogai et al., 2006; Lipuma et al., 2014).

Figure 2: Protein sequence homology and 3D prediction structure of VapC7 toxin

- A. Homology of the deduced amino acid sequences of toxins VapC4, VapC5 and VapC7 of *Sinorhizobium meliloti*; VapCLT12 of *Salmonella enterica* and VapC of *Haemophilus influenza* aligned by Muscle (MULTiple Sequence Comparison by Log-Expectation

<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>) and compared to a VapC model of *Shigella flexneris* to determine the secondary structure. Conserved amino acids of the catalytic site were marked in red *. Esript software was used for the representation (Robert, X. and Gouet, P. 2014).

B. Prediction of the 3D structures of VapC7 of *S. meliloti* (blue) and VapC of *S. flexneris* (green). The Software Phyre2 (Kelley LA and Sternberg MJE 3D. *Nature Protocols* 2009) was used to predict the tertiary structure. The representation was done with Pymol software. The 3 conserved acidic amino acids were represented in yellow.

Figure 3. *In vitro* ribonuclease activity of purified *S. meliloti* VapC7

A-B. Expression and purification of recombinant VapBC7

S. meliloti VapC7 was expressed from pET28A vector in *E. coli* BL21(DE3) pLysS cells and purified using HisPur Ni-NTA resin (Thermo Scientific) with different imidazole concentrations in wash and elution steps .

A. SDS-PAGE analysis of protein fractions

Proteins were separated on a 15% (w/v) polyacrylamide gel under denaturing conditions and stained with Coomassie brilliant blue R250.

Lane1, crude extract of non-induced BL21 (DE3) pLysS-pET28A/VapBC7 (20 µg); lane 2, crude extract of induced (IPTG 1 mM/3h) BL21 (DE3) pLysS- pET28A/VapBC7 (20 µg); lane 3, wash with 50 mM Imidazole (20 µg); lane 4, elution with 250 mM imidazole (5 µg). The asterisk indicates the position of the VapB7 antitoxin.

(Molecular masses are indicated on the left in kilodaltons)

B. Western blot analysis of protein fractions

Corresponding immunoblot analysis after incubation with polyclonal rabbit antibodies raised against HisTag (GenScript, 1/3000)

C. RNase activity assay.

Different amounts (5.2, 10.4, 13, 52 pmol) of purified VapC7-His₆ were incubated with 1.4 pmol of MS2 RNA in Tris-HCl 50 mM pH 8 for 30 min at 30°C. RNA degradation was visualized on agarose gel 1.2% with EtBr staining. A positive control is realized in the same conditions with 0,146 pmol of RNase A.

Incubation of MS2 RNA with: Elution buffer; (2) RNase A (0.146 pmol); (3) RNase A (0.146 pmol) boiled 20 min; (4) VapC7 (5.2 pmol); (5) VapC7 (10.4 pmol); (6) VapC7 (13 pmol); (7) VapC7 (52 pmol); (8) VapC7 (52 pmol) boiled 20 min.

Figure 4. Autoregulation of *vapBC7* operon

The *vapBC7* promoter region was isolated and cloned in the HindIII/PstI site of the broad-host-range vector pEP82 (Elo et al., 1998) upstream of the *lacZ* reporter gene. The resulting construct, pRB97 was used in β -galactosidase assays to detect *vapBC7* promoter activity. Enzyme activities were calculated as Miller units in three independent experiments.

Figure 5. Symbiotic phenotype of the *vapC7* mutant.

The symbiotic phenotype analysis was realized on *Medicago truncatula*, six weeks post-infection by the WT or *vapC7* mutant strains. All experiments were done in triplicate. The asterisk (*) indicates a significant difference (test Anova, P<0.05).

- A. Picture of *Medicago truncatula* after 6 weeks inoculation with the WT or *vapC7* mutant strains.
- B. Plant yield. The length of aerial part was measured on an average of 50 plants.
- C. Nitrogen fixation efficiency of the wild-type *S. meliloti* 2011 (empty column) and the *vapC7* mutant (grey column) strains determined by acetylene reduction assay (Herouart et al., 1996).
- D. Nodule surface area was determined on 50 nodules. The median was indicated and the standard deviation.

Figure 6. The *vapC7* nodules are early senescent.

- A. Ultrastructure of 6 wpi old nodules infected with WT (a) or *vapC7* (b) mutant strains. Thin sections (5 μm) of the nodules were stained with Toluidine Blue. The microscopic pictures shown are representative of the analysis of nodule sections from three biological replicates. The different zones of the nodules are indicated (see the text).

Bars 100 μm
- B. Zoom in WT (a) and *vapC7* mutant (b) nodules. Bars 5 μm
- C. Infected cells of WT (a) and mutant *vapC7* (b) nodules. Bars 2 μm

Figure 7. Senescence phenotype of mutant *vapC7* characterized by induction of plant senescent markers

Two plant genes specifically expressed in the fixing zone, encoding leghemoglobin and NCR001, and three plant genes especially expressed in the senescent part of the nodules, encoding proteases (CP6, CP2 and VPE) were retained for expression study. The qPCR

experiments were realized on three technical replicates from two independent biological experiments. The data shown are normalized with R software on the “WT” condition, using the plant reference genes MtC27 and 40S. The asterisk (*) indicates a significant difference (Anova test, $P < 0.05$).

Figure 8. Ploidy and differentiation of the nodule cells.

Ploidy of bacteroid and plant cells in WT and *vapC7* mutant nodules. The number of chromosomes per cell (free bacteria, bacteroids, plant cell nuclei) was determined using the DAPI dye (for bacteria) or the PI dye (for nuclei). The quantity of fluorescence per cell was quantified according to the number of events observed by flow cytometry. These experiments were done on three biological replicates.

- A. WT and *vapC7* bacteroid ploidy. Bacteroids were extracted from nodules harvested 3 wpi. Free living bacteria in exponential phase of growth were used as a control.
- B. Plant cell ploidy. The nuclei from plant cells were extracted on 3 wpi root WT and *vapC7* mutant nodules.
- C. Infected cells in the fixation zone III of WT (a, c) and *vapC7* (b, d) nodules observed from TEM (Transmission Electronic Microscopy) analysis.

Figure 9. The *vapC7* bacteroids viability is strongly affected *in planta*.

The WT and *vapC7* induced nodules (3 wpi) were extemporary cut in thin sections using a vibratome after inclusion in agarose, stained with live/dead fluorescent dyes and observed by confocal microscopy.

Figure 10. The vapC7 mutant affects Reactive Oxygen Species synthesis in root nodules

A. Histological analysis of ROS production in nodule. WT, *vapC7* and *nifH* nodules at 3 weeks post-inoculation were cut in sections with vibratome after inclusion in agarose. The sections were further stained with Nitroblue tetrazolium (NBT). The accumulation of anion superoxyde is visible by the formation of a blue precipitate. Negative control was done with an NADPH oxidase inhibitor (Diphenyleneiodonium, DPI) treatment.

B. Rboh gene expression. qRT-PCR on RNA extracted from WT or *vapC7* nodules (3wpi) and the relative expression of the 10 Respiratory Burst Oxidase Homologue (Rboh) of *Medicago truncatula* was determined. The qPCR experiments were realized on three technical replicates from two independent biological experiments. Values were normalized with R software on the “WT” condition, using the plant reference genes MtC27 and 40S.

Supplemental data

Figure S1. Expression of *vapC4* (*ntrR*) and *vapC5* toxin genes in 2011-induced nodules

The transcript accumulation of *vapC4* (*ntrR*) and *vapC5* genes in the different zones of *S. meliloti* 2011 induced nodule was represented in normalized RPKM (<https://iant.toulouse.inra.fr/symbimics>) (Roux et al., 2014).

Figure S2. Homology of VapB7 antitoxin

Homology of the deduced amino acid sequences of the antitoxin VapB5 with antitoxins VapB5 of *S. meliloti*; VapB2 of *Rickettsia felis*, VapB of *Salmonella enterica* str. LT2 and VapB1 of *Haemophilus influenza* aligned by Muscle (MUltiple Sequence Comparison by Log-Expectation <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>). Conserved amino acids were marked in red. Esript was used for representation (Robert, X. and Gouet, P. 2014).

Figure S3. Nodulation kinetics of wild-type and *vapC7* mutant strains of *S. meliloti*.

Figure S4. Growth kinetics of wild-type and *vapC7* mutant strains of *S. meliloti* in free living conditions

Table S1. Bacterial strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Relevant characteristics	Source/Reference
Strain		
<i>Sinorhizobium meliloti</i>		
Sm2011	wild-type, derivative of SU47, Sm ^R	Rosenberg et al., 1981
UNA404	derivative of Sm2011, mTn5-STM carrying Neo ^R insertion in <i>vapC7</i> gene	Pobigaylo et al., 2006,
<i>Escherichia coli</i>		
DH5α	F- <i>supE44</i> Δ <i>lacU169</i> (Φ80 <i>dlacZDM15</i>) <i>hsdR17</i> (<i>rK-mK+</i>) <i>recA1 endA1</i> <i>gyrA96 thi-1 relA1</i>	Sambrook et al., 1989
MT616	<i>pro-82 thi-1 hsdR17supE44</i> <i>recA56</i>	Finan et al., 1986
Plasmid		
pGEM-T	cloning vector with f1 <i>oriR</i> ; Ap ^r	Promega
pBAD24	<i>colE1 ori</i> , arabinose inducible promoter, Amp ^R	Guzman et al. 1995
pEP82	broad-host-range plasmid with <i>lacZ</i> , Tet ^R	Elö et al. 1998
pRB97	Fragment carrying the <i>vapBC7</i> promoter region in pEP82, Tet ^R	This work
pGC165	<i>vapC7</i> coding region in the pBAD24, Amp ^R	This work
pGC101	<i>vapB7</i> coding region in the pBAD24, Amp ^R	This work
pGC107	<i>vapBC7</i> module cloned in pBAD24, Amp ^R	This work

Sm, Streptomycin ; Neo, Neomycin ; Tet, Tetracyclin ; Cm, Chloramphenicol ; Ap, Ampicillin

Table S2. Primers used in this study.

Marker gene	Forward	Reverse
Leg	ATAGCTCATATGAGGCATTCAA	GAGTTGAGGACTATCTTGTACT
NCR001	CACTTCTGACGCTAACTG	TGAACCTTCAATATAACCACC
Mtc27	TGAGGGAGCAACCAAATACC	GCGAAAACCAAGCTACCATC
40S	AAGAAGGGAAAGAGTGCTGCT	GGTGTCCAATTAACACTCAACC
Sma00324	GTGGAATCGGAAGCGAAAGA	GGTGATCTTATAGGCGTTGCG
16S	TCTACGGAATAACGCAGG	GTGTCTCAGTCCCAATGT
MtVPE	CCAGGGGTTCTTGGTATGCCCCG	ACTGCCAGATTCACATGCCTCCA
MtCP6	CCTGCTGCTACTATTGCTGGATATG	CACTCGCATCAATGGCTACGG
MtRbohA	GCGCAACTCCTTTGATTAGC	GAAATAGGCTCGCTTGGTTG
MtRbohB	GCTCGCTCTGCTCTTATTGC	TGCGCTTGTAGACACTACGC
MtRbohF	GAAGATGGCAAACCAAACTTG	TTCTGCGGTTTTTCGTGATCC
MtRbohI	CGCCTGCACAAGATTACCA	GTGTTTGAGTCCATTTGTTTCGT
MtCP3	AGCATCTTACCCTACTG	ATATACATAAATCGCAAAT

Table S3.

Strain	Total events	1-2c events (%)	nc events (%)
WT	126471	68327 (54%)	52327 (41%)
vapC7	91620	62758 (68%)	28839 (31%)

- Ahidjo BA, Kuhnert D, McKenzie JL, Machowski EE, Gordhan BG, Arcus V, Abrahams GL, Mizrahi V** 2011. VapC Toxins from *Mycobacterium tuberculosis* Are Ribonucleases that Differentially Inhibit Growth and Are Neutralized by Cognate VapB Antitoxins. *PLoS ONE* **6**: e21738.
- Andrio E, Marino D, Marmeys A, de S, Marion Dunoyer, Damiani I, Genre A, Huguet S, Frendo P, Puppo A** 2013. Hydrogen peroxide-regulated genes in the *Medicago truncatula*, *Sinorhizobium meliloti* symbiosis. *New Phytologist* **198**: 179–189.
- Audoly G, Vincentelli R, Edouard S, Georgiades K, Mediannikov O, Gimenez G, Socolovschi C, Mège J-L, Cambillau C** 2011. Effect of Rickettsial Toxin VapC on Its Eukaryotic Host. *PLoS ONE* **6**: e26528.
- Bodogai M, Ferenczi S, Bashtovyy D, Miclea P, Papp P, Dusha I** 2006. The ntrPR operon of *Sinorhizobium meliloti* is organized and functions as a toxin-antitoxin module. *Mol Plant Microbe Interact* **19**: 811–822.
- Cam Y, Pierre O, Boncompagni E, Hérouart D, Meilhoc E, Bruand C** 2012. Nitric oxide (NO): a key player in the senescence of *Medicago truncatula* root nodules. *New Phytologist* **196**: 548–560.
- Daines DA, Wu MH, Yuan SY** 2007. VapC-1 of Nontypeable *Haemophilus influenzae* Is a Ribonuclease. *Journal of Bacteriology* **189**: 5041–5048.
- Dienemann C, Boggild A, Winther KS, Gerdes K, Brodersen DE** 2011. Crystal Structure of the VapBC Toxin-Antitoxin Complex from *Shigella flexneri* Reveals a Hetero-Octameric DNA-Binding Assembly. *Journal of Molecular Biology* **414**: 713–722.
- Elo P, Semsey S, Kereszt A, Nagy T, Papp P, Orosz L** 1998. Integrative promoter cloning plasmid vectors for *Rhizobium meliloti*. *FEMS Microbiol Lett* **159**: 7–13.
- Galbraith Davidw, Harkins Kristir, Maddox Joycem, Ayres Nicolam, Sharma Dharamp, Firoozabady Ebrahim** 1983. Rapid Flow Cytometric Analysis of the Cell Cycle in Intact Plant Tissues. *Science* **220**: 1049–1051.
- Gerdes K, Christensen SK, Lobner-Olesen A** 2005. Prokaryotic toxin-antitoxin stress response loci. *Nat Rev Microbiol* **3**: 371–382.
- Gonzalez-Sama A, de IP, Teodoro Coba, Kevei Z, Mergaert P, Lucas MM, de F, Maria R., Kondorosi E, Pueyo JJ** 2006. Nuclear DNA Endoreduplication and Expression of the Mitotic Inhibitor Ccs52 Associated to Determinate and Lupinoid Nodule Organogenesis. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **19**: 173–180.

- Haag AF, Baloban M, Sani M, Kerscher B, Pierre O, Farkas A, Longhi R, Boncompagni E, Hérouart D** 2011. Protection of *Sinorhizobium* against Host Cysteine-Rich Antimicrobial Peptides Is Critical for Symbiosis. *PLoS Biology* **9**: e1001169.
- Hérouart D, Sigaud S, Moreau S, Frendo P, Touati D, Puppo A** 1996. Cloning and characterization of the *kata* gene of *Rhizobium meliloti* encoding a hydrogen peroxide-inducible catalase. *J Bacteriol* **178**: 6802–6809.
- Hérouart D, Sigaud S, Moreau S, Frendo P, Touati D, Puppo A** 1996. Cloning and characterization of the *kata* gene of *Rhizobium meliloti* encoding a hydrogen peroxide-inducible catalase. *Journal of Bacteriology* **178**: 6802–6809.
- Hirsch AM, Bang M, Ausubel FM** 1983. Ultrastructural analysis of ineffective alfalfa nodules formed by *nif*::Tn5 mutants of *Rhizobium meliloti*. *J Bacteriol Journal of Bacteriology* **155**: 367–380.
- Lipuma J, Cinege G, Bodogai M, Olah B, Kiers A, Endre G, Dupont L, Dusha I** 2014. A vapBC-type toxin-antitoxin module of *Sinorhizobium meliloti* influences symbiotic efficiency and nodule senescence of *Medicago sativa*. *Environmental Microbiology* n/a–n/a.
- Lopes APY, Lopes LM, Fraga TR, Chura-Chambi RM, Sanson AL, Cheng E, Nakajima E, Morganti L, Martins EAL** 2014. VapC from the Leptospiral VapBC Toxin-Antitoxin Module Displays Ribonuclease Activity on the Initiator tRNA. *PLoS ONE* **9**: e101678.
- Marino D, Andrio E, Danchin EGJ, Oger E, Gucciardo S, Lambert A, Puppo A, Pauly N** 2011. A *Medicago truncatula* NADPH oxidase is involved in symbiotic nodule functioning. *New Phytologist* **189**: 580–592.
- Maunoury N, Redondo-Nieto M, Bourcy M, Van de Velde W, Alunni B, Laporte P, Durand P, Agier N, Marisa L** 2010. Differentiation of symbiotic cells and endosymbionts in *Medicago truncatula* nodulation are coupled to two transcriptome-switches. *PLoS One* **5**: e9519.
- McKenzie JL, Duyvestyn JM, Smith T, Bendak K, MacKay J, Cursons R, Cook GM, Arcus VL** 2012. Determination of ribonuclease sequence-specificity using Pentaprobosc and mass spectrometry. *RNA* **18**: 1267–1278.
- Mergaert P, Uchiumi T, Alunni B, Evanno G, Cheron A, Catrice O, Mausset AE, Barloy-Hubler F, Galibert F et al.** 2006. Eukaryotic control on bacterial cell cycle and differentiation in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 5230–5235.
- Mergaert P, Nikovics K, Kelemen Z, Maunoury N, Vaubert D, Kondorosi A, Kondorosi E** 2003. A Novel Family in *Medicago truncatula* Consisting of More Than 300 Nodule-

- Specific Genes Coding for Small, Secreted Polypeptides with Conserved Cysteine Motifs. *Plant Physiol Plant Physiology* **132**: 161–173.
- Miallau L, Faller M, Chiang J, Arbing M, Guo F, Cascio D, Eisenberg D** 2009. Structure and Proposed Activity of a Member of the VapBC Family of Toxin-Antitoxin Systems: VapBC-5 from *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Biological Chemistry* **284**: 276–283.
- Minchin FR** 1997. Regulation of oxygen diffusion in legume nodules. *Soil Biology and Biochemistry* **29**: 881–888.
- Montiel J, Nava N, Cardenas L, Sanchez-Lopez R, Arthikala M-K, Santana O, Sanchez F, Quinto C** 2012. A Phaseolus vulgaris NADPH Oxidase Gene is Required for Root Infection by Rhizobia. *Plant and Cell Physiology* **53**: 1751–1767.
- Nanda AK, Andrio E, Marino D, Pauly N, Dunand C** 2010. Reactive Oxygen Species during Plant-microorganism Early Interactions. *Journal of Integrative Plant Biology* **52**: 195–204.
- Olah B, Kiss E, Gyorgypal Z, Borzi J, Cinege G, Csanadi G, Batut J, Kondorosi A, Dusha I** 2001. Mutation in the ntrR gene, a member of the vap gene family, increases the symbiotic efficiency of *Sinorhizobium meliloti*. *Mol Plant Microbe Interact* **14**: 887–894.
- Ott T, van D, Joost T., Gunther C, Krusell L, Desbrosses G, Vigeolas H, Bock V, Czechowski T, Geigenberger P et al.** 2005. Symbiotic Leghemoglobins Are Crucial for Nitrogen Fixation in Legume Root Nodules but Not for General Plant Growth and Development. *Current Biology* **15**: 531–535.
- Pandey DP, Gerdes K** 2005. Toxin-antitoxin loci are highly abundant in free-living but lost from host-associated prokaryotes. *Nucleic Acids Res* **33**: 966–976.
- Pérez G, Juan Carlos, Coussens G, De K, Annick, De R, Riet, De B, Stefanie, Van DV, Willem, Goormachtig S, Holsters M** 2010. Comparison of Developmental and Stress-Induced Nodule Senescence in *Medicago truncatula*. *Plant Physiology* **152**: 1574–1584.
- Pobigaylo N, Wetter D, Szymczak S, Schiller Ulf, Kurtz S, Meyer F, Nattkemper TW, Becker A** 2006. Construction of a Large Signature-Tagged Mini-Tn5 Transposon Library and Its Application to Mutagenesis of *Sinorhizobium meliloti*. *Applied and Environmental Microbiology* **72**: 4329–4337.
- Roux B, Rodde N, Jardinaud M-F, Timmers T, Sauviac L, Cottret L, Carrère S, Sallet E, Courcelle E** 2014. An integrated analysis of plant and bacterial gene expression in symbiotic root nodules using laser-capture microdissection coupled to RNA sequencing. *The Plant Journal Plant J* **77**: 817–837.

- Sallet E, Roux B, Sauviac L, Jardinaud M-F, Carrère S, Faraut T, de Carvalho-Niebel F, Gouzy J, Gamas P** 2013. Next-Generation Annotation of Prokaryotic Genomes with EuGene-P: Application to *Sinorhizobium meliloti* 2011. *DNA Research* **20**: 339–354.
- Timmers A, Soupène E, Auriac M-C, de Billy F, Vasse J, Boistard P, Truchet G** 2000. Saprophytic Intracellular Rhizobia in Alfalfa Nodules. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **13**: 1204–1213.
- Van de Velde W, Guerra JC, De Keyser A, De Rycke R, Rombauts S, Maunoury N, Mergaert P, Kondorosi E, Holsters M** 2006. Aging in legume symbiosis. A molecular view on nodule senescence in *Medicago truncatula*. *Plant Physiol* **141**: 711–720.
- Vinardell JM, Fedorova E, Cebolla A, Kevei Z, Horvath G, Kelemen Z, Tarayre S, Roudier F, Mergaert P** 2003. Endoreduplication mediated by the anaphase-promoting complex activator ccs52a is required for symbiotic cell differentiation in *Medicago truncatula* nodules. *The Plant Cell Online* **15**: 2093–2105.
- Winther KS, Gerdes K** 2011. Enteric virulence associated protein VapC inhibits translation by cleavage of initiator tRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 7403–7407.

CONCLUSION PARTIE 3 :

LE SYSTEME VAPBC7 :

UN SYSTEME TOXINE ANTITOXINE ESSENTIEL A LA SURVIE

DE LA BACTERIE DANS LA CELLULE HOTE

Notre caractérisation du module VapBC7 de *S. meliloti* en interaction avec *M. truncatula*, a permis de mettre en évidence un nouveau rôle pour les systèmes VapBC de *S. meliloti*. La mutation du gène *vapC7*, entraîne un phénotype de type Fix^{+/-} avec une sénescence nodositaire précoce. L'analyse fine du phénotype symbiotique induit par ce mutant, montre que l'invalidation de la toxine VapC7 conduit à une baisse de l'efficacité de différenciation des bactéroïdes, et de façon intéressante, à une perte rapide de leur viabilité. Au niveau du partenaire végétal, l'interaction avec ce mutant s'accompagne d'une accumulation d'anion superoxide à l'origine d'une bouffée oxydante qui pourrait être impliquée dans l'éviction des bactéroïdes *vapC7*, dont la capacité fixatrice est défectueuse. Cette réaction oxydante, essentiellement due à la surexpression du gène *MtRbohF*, ne semble pas être retrouvée lors de l'interaction avec le mutant *nifH* (Nod⁺Fix⁻), bien que ce mutant soit également capable d'induire des nodosités et de se différencier. La différence majeure entre les deux mutants réside dans le fait qu'alors que *nifH* n'est pas du tout fixateur, le mutant *vapC7* l'est partiellement. Cette différence pourrait expliquer une réaction de la plante particulière qui pourrait s'apparenter à une réaction de type HR (Réponse Hypersensible).

Bien que jamais décrit pour une bactérie interagissant avec une plante, le rôle « positif » d'un système toxine antitoxine sur la survie de bactéries dans une cellule hôte eucaryote, a été récemment montré dans des études portant sur des bactéries pathogènes de l'homme. Ainsi, chez *H. influenzae*, les systèmes VapBC de cette bactérie pathogène ont été montrés comme important pour sa survie *in vitro* dans des cultures cellulaires humaines et *in vivo* dans un modèle d'infection de chinchilla (Ren et al., 2012). Dans une autre étude, concernant un modèle souris / *Salmonella typhimurium*, il a été montré qu'un système TA pouvait être impliqué dans la survie de la bactérie dans les organes lymphoïdes (De la Cruz et al., 2013). Cependant, les études démontrant les effets des systèmes TA *in vivo* sont plus rares, et la plupart des analyses concernant le rôle biologique de ces modules restent faites *in vitro*. Ainsi, l'activation de ces systèmes *in vitro*, suite à la perception de stress analogues

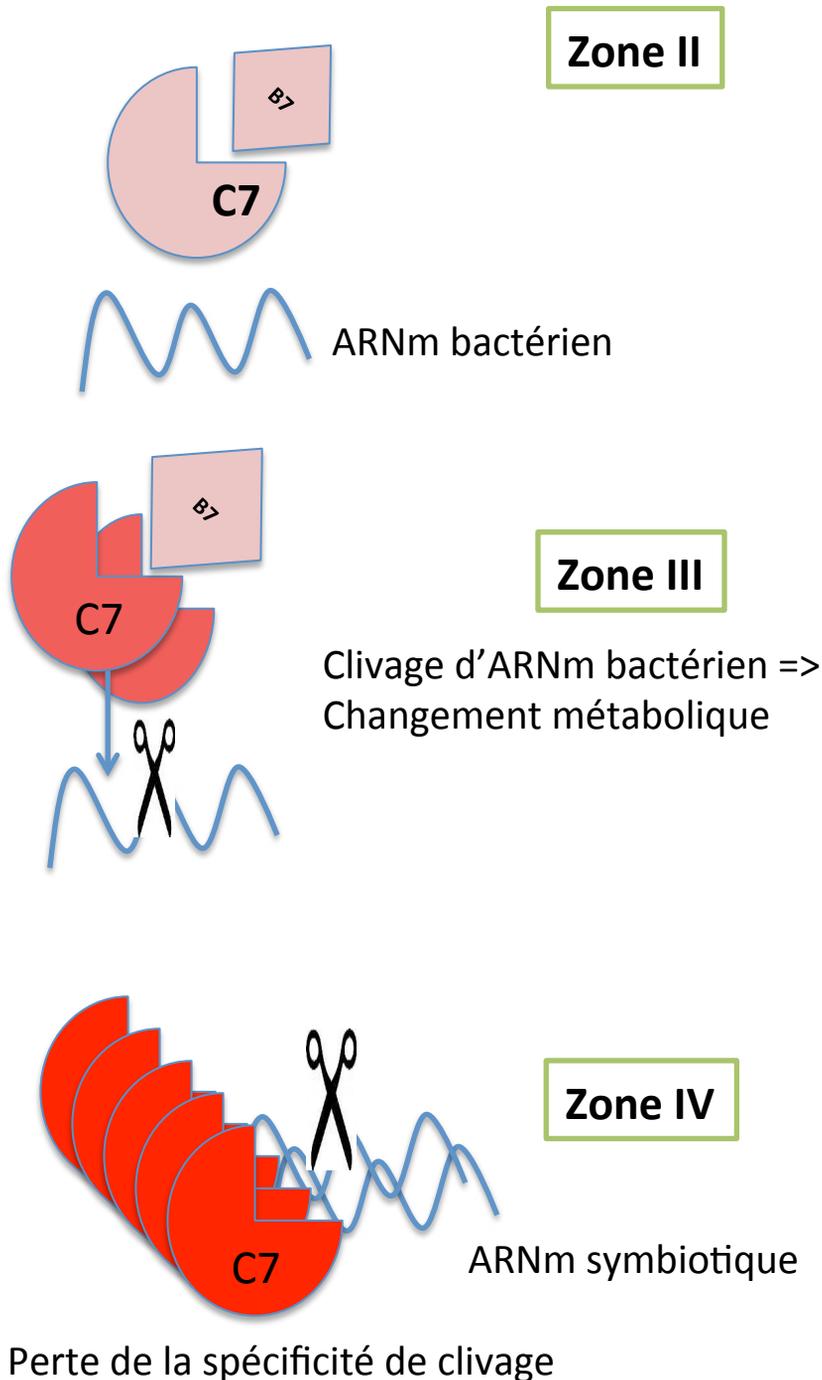


Figure 5 ✓. Modèle proposé pour le rôle de la RNase VapC7 *in planta* dans un contexte sauvage WT

La variation de la quantité de toxine VapC7 et d'antitoxine VapB7 dans la nodosité est représentée par un dégradé de couleur allant du rose clair (peu présente) au rouge (surproduite). Ce modèle est basé sur les données de RNAseq obtenues pour déterminer le profil d'expression de l'opéron *vapBC7* (B. Roux et al. 2014).

à ceux rencontrés par la bactérie *in vivo*, avaient permis de suggérer un rôle de ces systèmes dans la pathogénicité et la virulence bactérienne dans la cellule hôte (Christensen et al., 2003; Ramage et al., 2009).

Grâce à la dégradation *in vitro* d'un ARN modèle (ARN du phage MS2) par la protéine VapC7 purifiée, nos travaux ont permis de montrer que cette toxine avait une activité RNase. Afin de mieux caractériser les cibles moléculaires de cette ARN interférase et comprendre mieux son rôle dans la symbiose, il serait intéressant de déterminer quels types d'ARN elle peut cliver et quel est son site spécifique de clivage. La détermination de la séquence ciblée par cette RNase pourrait permettre de prédire les ARN bactériens ciblés et ceux préservés par son action. Si on confronte les résultats phénotypiques obtenus avec le mutant *vapC7* et le profil d'expression du gène *vapC7* dans la nodosité WT, on peut supposer que cette toxine a une spécificité de clivage et va, suite à sa « libération » de son antitoxine, dégrader certains ARNm à certaines étapes de la symbiose. Ces dégradations semblent essentielles à la symbiose car en absence de toxine on obtient un phénotype de sénescence nodositaire accélérée. La comparaison de l'accumulation de transcrits *vapC7* et *vapB7* dans la nodosité, montre des profils d'expression différents où le gène de l'antitoxine semble peu exprimé au regard de celui du gène de la toxine, alors même qu'ils font partie d'un même opéron. Cette différence pourrait s'expliquer par le fait que la toxine VapC7 dégrade le transcrit de l'antitoxine VapB7. Sachant que l'équilibre toxine/antitoxine est déterminant, ce phénomène contribuerait à faire basculer le ratio des deux protéines en faveur de la toxine. Cette toxine se retrouverait ainsi en excès par rapport à l'antitoxine en zone de fixation et pourrait alors participer à la reprogrammation liée aux changements métaboliques (carboné, azoté, réponse aux stress) nécessaires à la bactérie qui termine sa différenciation (endoreduplication,...).

Enfin, l'accumulation de transcrits *vapC7* augmentant fortement dans la partie basale de la nodosité, enrichie en zone de sénescence (Figure 51 de la partie 1 Résultats), il est possible que la surproduction de la toxine s'accompagne par une perte de sa spécificité de clivage. Dans ce contexte, elle pourrait dégrader des ARNm essentiels à la survie du bactéroïde et participer ainsi au processus de sénescence (Figure 5 ✓). En effet, les mesures d'activités RNase de toxines VapC d'autres bactéries, ont pu montrer que cette activité RNase était dose dépendante sur différentes cibles moléculaires (Lopes et al., 2014).

En conclusion, un nouveau rôle d'un système VapBC de *S. meliloti* a pu être mis en évidence et on remarque qu'un module proche de VapBC4 et VapBC5 ne présente *a priori* pas la même fonction biologique, bien que proche d'un point de vue de la structure des protéines

de ces deux systèmes. D'autres éléments doivent donc rentrer en jeu pour que ces systèmes aient des rôles précis et différents en interaction symbiotique. Cela pourrait être une réponse à des signaux différents ou une spécificité de clivage de la toxine différente. Ces hypothèses restent à démontrer.

CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES

I. Les systèmes TA de la famille VapBC jouent un rôle majeur dans la symbiose avec *Medicago sp.*

A. Etude des mutants *vapC*

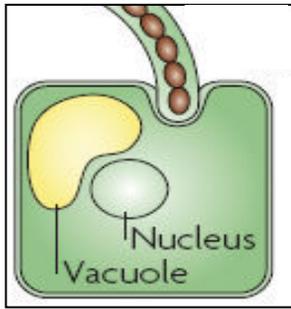
Pour réaliser l'analyse globale des 11 systèmes TA chromosomiques de la famille VapBC de *S. meliloti*, nous avons choisi de construire des souches mutantes invalidées pour chaque gène *vapC*. L'analyse de ces souches en culture n'a pas permis d'observer un phénotype particulier en comparaison avec la souche WT, suggérant que, dans les conditions expérimentales utilisées (croissance en milieu riche), ces systèmes n'ont pas de rôle biologique. Les profils d'expression des opérons *vapBC*, montrent qu'ils ne sont que faiblement exprimés en culture (Sallet et al., 2013) ce qui pourrait expliquer l'absence de phénotype. Toutefois, certains d'entre eux, spécifiquement induits en phase stationnaire, suggèrent qu'un stress de type carence nutritionnelle ou arrêt de croissance, soit perçu comme un signal d'activation de ces modules.

Inversement, de manière originale, sept mutants *vapC* sur les onze présentent un phénotype symbiotique, en interaction avec *Medicago sp.* et seulement quatre n'ont pas de phénotype différent de celui obtenu avec la souche WT. Deux mutants *vapC* sont incapables de former des nodosités (phénotype Nod⁻), d'autres (3, hôtes confondus) ont une capacité fixatrice d'azote réduite (Phénotype Fix^{+/-}) et enfin certains (3 sur les 2, hôtes confondus), une meilleure efficacité symbiotique (Phénotype Fix⁺⁺) (**Tableau 4**).

Notre étude portant sur les systèmes TA chromosomiques de la famille VapBC de *S. meliloti*, montre pour la première fois (à l'exception du module NtrPR), que ces systèmes jouent un rôle dans les premières étapes de l'infection, dans la différenciation bactéroïdienne, dans la viabilité intracellulaire, dans l'efficacité de la capacité fixatrice d'azote et même dans l'entrée en sénescence nodositaire, impactant ainsi positivement ou négativement le

Reconnaissance plante/bactérie

Pénétration racinaire

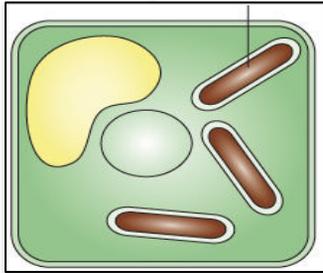
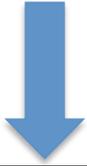


**Bactéries dans cordon
d'infection**

ARNm non symbiotique
(essentiels au mode de vie
libre)

VapC3, VapC9
(*M. truncatula*)

Zone d'infection (II)

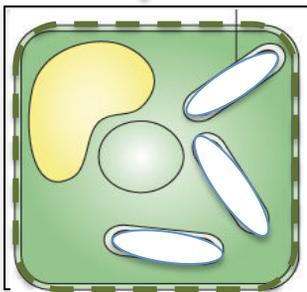


Bactéroïdes fixateurs

ARNm non symbiotique
ARNm symbiotique

VapC7, VapC2
(*M. truncatula*)

Zone de fixation (III)



Bactéroïdes sénescents

ARNm symbiotique
ARNm impliqués dans la
dégradation du bactéroïde

VapC5, VapC4
(*M. sativa*), VapC10
(*M. truncatula*)

Zone de Sénescence (IV)

Figure 58 : Modèle proposé concernant les cibles putatives des toxines VapC de *S. meliloti* dans la souche WT au cours de l'interaction symbiotique

L'analyse des différents phénotypes des mutants *vapC* en interaction avec *M. sativa* ou *M. truncatula* a permis de proposer l'hypothèse que les toxines VapC auraient différentes cibles visant certaines populations d'ARNm (indiquées flèches noires). Les ARNm qui seraient dégradés en condition WT sont indiqués en rouge et les ARNm qui seraient induits en condition WT sont en vert.

rendement végétal. La question se pose alors de savoir comment des systèmes TA de la même famille peuvent être impliqués dans des étapes très différentes de la symbiose allant de sa mise en place à la sénescence nodositaire ?

B. Les systèmes VapBC : rôle comme régulateur global pour l'adaptation de *S. meliloti* à la vie symbiotique ?

Une des hypothèses sur le rôle des VapBC de *S. meliloti* serait qu'ils soient impliqués dans les modifications importantes (arrêt de croissance, endoreduplication du génome, environnement microaérobie, changement de l'alimentation carbonée, métabolisme modifié,...) liées au passage d'un mode de vie libre à symbiotique fixateur d'azote dans la nodosité.

- Les mutants *vapC* de phénotype Nod⁻ : *vapC3* et *vapC9*

Les mutants *vapC3* et *9* ont été montrés comme inhibés dans leur capacité à noduler des racines de *M. truncatula*. Toutefois, des études plus poussées sont nécessaires afin de déterminer à quelle étape précise sont bloqués ces mutants. Est-ce un problème de reconnaissance plante-bactérie ? La pénétration et la formation des cordons d'infection sont-elles affectées ? Si ce n'est pas le cas, le relargage des bactéries dans la cellule végétale a-t-il lieu ? Une perspective consisterait en l'introduction dans ces souches d'un plasmide exprimant de manière constitutive le gène *lacZ* permettant de « tracer » les bactéries et de suivre ainsi leur progression racinaire par coloration histochimique *in situ*, afin de répondre à ces questions.

Si l'on suppose, (ce qui reste à démontrer de façon expérimentale) que les toxines VapC3 et VapC9 agissent, comme VapC7, en tant que RNases, différentes hypothèses peuvent être formulées pour expliquer le phénotype Nod⁻. Sachant que ces gènes ne sont pas ou peu exprimés dans la nodosité fonctionnelle (Roux et al., 2014), et sachant qu'ils jouent un rôle dans les premières étapes de l'interaction, ces toxines pourraient dégrader spécifiquement des ARNm importants pour la vie libre dans la rhizosphère et préserver de la dégradation des ARNm essentiels dans les premières étapes : perception de signaux de la plante (flavonoïdes, lutéoline), ARNm des gènes *nod*, ou de gènes impliqués dans l'adaptation à

des stress type stress oxydatif (**Figure 5x**) . En effet, comme décrit dans l'introduction (**Figure 20**), un burst oxydatif associé à la présence d'EAO et de NO est détecté dans le cordon d'infection. Il pourrait être intéressant d'étudier *in vitro*, l'expression de ces deux opérons suite à l'ajout d'EAO (H₂O₂ par exemple), afin de mimer le ou les stress rencontrés par les bactéries au moment de la reconnaissance avec la plante.

**- Les mutants *vapC* altérés dans leur capacité fixatrice d'azote (Nod⁺ Fix^{+/-}):
vapC2 vapC5 et *vapC7* en interaction avec *M. truncatula***

Les mutants *vapC* de phénotype Nod⁺ Fix^{+/-} ne sont pas affectés dans leur capacité à noduler, mais présentent une activité fixatrice d'azote réduite mais non nulle. Ceci suggère que l'invalidation de la toxine affecte une étape plus tardive du processus symbiotique, concernant le bactéroïde fixateur en zone III. Il peut s'agir (i) d'un problème concernant le nombre de bactéroïdes présents/cellule infectée (moins de bactéroïdes fixateurs entraînerait au niveau de la nodosité une fixation d'azote réduite) ; (ii) d'une moins bonne efficacité dans le degré de différenciation en bactéroïdes (problème d'endoreduplication) ; (iii) d'une perte de viabilité des bactéroïdes dans la zone III due à un problème d'adaptation bactérien à ce nouvel environnement. En effet, la zone III constitue un environnement microoxique (la concentration en O₂ dans les cellules infectées de la nodosité est de 10 à 50 nM alors qu'à la surface de la nodosité elle est de 250 μM) (Galvez et al., 2000), le symbiosome qui héberge le bactéroïde représente un compartiment acide où le pH est de 4,5 à 5 (Pierre et al., 2013), l'alimentation carbonée et énergétique du bactéroïde est dépendante d'une entrée et utilisation efficace d'acides dicarboxyliques (malate) provenant de la plante et de son activité photosynthétique.

Ainsi, si l'on suppose que ces systèmes VapBC participent à la survie du bactéroïde dans la cellule végétale en permettant une adaptation aux « stress » perçus par ce bactéroïde fixateur, comme la microoxie par exemple, des expériences pourraient être réalisées *in vitro*, pour appuyer cette hypothèse. L'étude de l'activité du promoteur *PvapBC7* dans un contexte WT, réalisée sur des cultures mimant des stress ressentis par le bactéroïde pourrait être menée. Des résultats préliminaires (non montrés) suggèrent que ce promoteur est effectivement induit par des conditions de culture en microoxie, et que la toxine VapC7 est présente dans ces conditions. Ces résultats sont à reproduire.

Les conséquences précises des mutations *vapC2* et *vapC5* sur l'étape symbiotique affectée n'ont pas été déterminées. Il serait intéressant de réaliser une étude de l'ultrastructure de la nodosité et d'analyser le degré de différenciation des bactéroïdes, par les mêmes approches que celles qui ont été menées dans le cas du mutant *vapC7* (partie 2 Résultats, article en cours de préparation).

Dans le mutant *vapC7*, nous avons pu mettre en évidence à la fois une diminution du nombre de bactéroïdes différenciés, mais également une perte de viabilité des bactéroïdes dans la cellule végétale. L'hypothèse que nous proposons est que la protéine VapC7, dont l'activité RNase a été démontrée *in vitro*, participerait au changement global du métabolisme que subit le bactéroïde pour survivre dans la cellule végétale et être accepté par la plante. Cette toxine pourrait jouer un rôle sur la dégradation d'ARNm non symbiotiques et préserver des ARNm permettant l'adaptation du symbiosome en zone III. Par exemple, des ARNm importants pour l'efficacité de différenciation, la survie en microoxie, la résistance au pH acide ou impliqués dans l'adaptation au nouveau métabolisme carboné du bactéroïde (**Figure 5x**) .

Dans la littérature, il est décrit que, chez *M. tuberculosis*, ces systèmes TA de la famille VapBC, pourraient être régulés par des stress abiotiques tels que l'hypoxie (Ramage et al., 2009). D'autre part, l'identification des séquences cibles de reconnaissance d'ARNm interféras de systèmes TA de *M. tuberculosis* (MazF-mt3 et MazF-mt7) a permis de mener une étude bioinformatique des ARNm les moins susceptibles à la dégradation par ces RNases (Zhu et al., 2008). Il en ressort que les 10 gènes dont les transcrits seraient les mieux protégés de cette dégradation correspondent à une famille de gènes proposés pour jouer un rôle dans l'immunopathogénicité de cette bactérie.

Les toxines VapC2 et VapC7 pourraient donc avoir un rôle comparable à ces toxines. Une perspective de ce travail consisterait, dans le cas de la toxine VapC7 dont la caractérisation fine est réalisée et pour laquelle, nous disposons de la protéine purifiée à :

i) déterminer la séquence cible de reconnaissance de VapC7 sur un ARN modèle et, disposant de cette séquence, de réaliser par une étude bioinformatique, un classement des gènes les moins susceptibles à la dégradation. En parallèle, des ARNm d'intérêt symbiotique et portant ces séquences de reconnaissance ainsi que les ARNm candidats préservés identifiés par bioinformatique et ne la possédant pas, pourraient être synthétisés et utilisés dans un test d'activité RNase *in vitro* en présence de la protéine VapC7 purifiée.

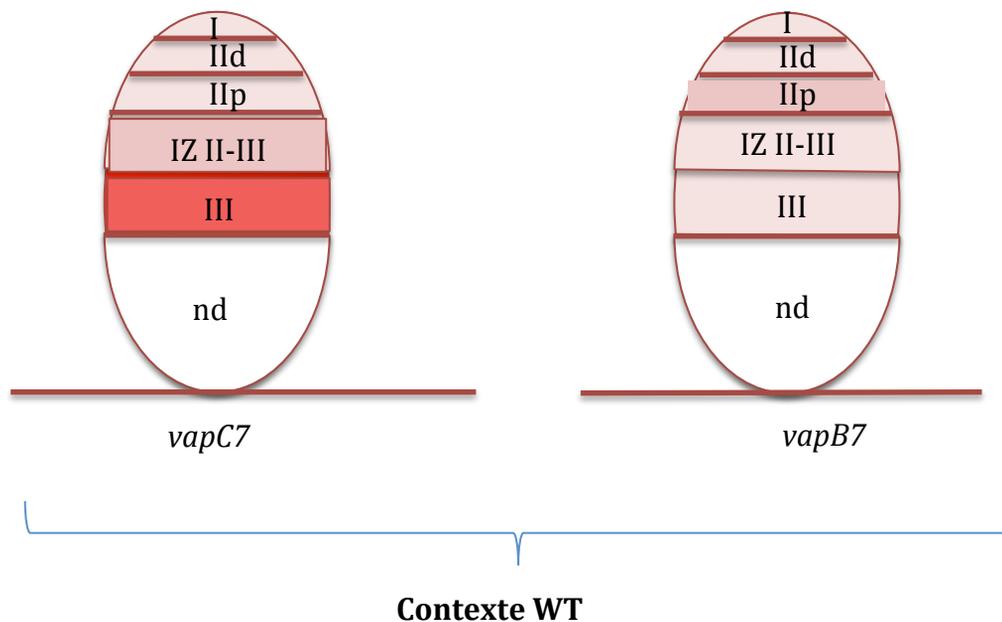


Figure 5* : Schématisation du profil d'expression des gènes *vapC7* et *vapB7* dans les différentes zones de la nodosité WT

Le niveau d'expression des gènes *vapC7* et *vapB7* est déterminé par les mesures de RNAseq réalisées sur des nodosité WT après micro-dissection laser (B. Roux et al. 2014). L'accumulation de transcrits a été définie en RPKM (Reads Per Kilobase per Million mapped reads). Plus la valeur de RPKM est élevée, plus l'expression est importante. Les variations d'expression sont visualisées grâce à un dégradé allant du blanc (pas d'expression) au rouge (forte expression). L'accumulation de transcrits dans la zone IV n'a pas été définie dans cette partie de l'étude.

ii) une seconde perspective pourrait consister à réaliser une étude comparative du transcriptome (RNAseq) bactérien de nodosités WT et mutantes *vapC7*, sur de jeunes nodosités (3 spi). Cette approche permettrait d'avoir une vision globale, des transcrits présents chez le mutant. En effet, même si VapC7 agit en tant qu'endoribonucléase, l'ARNm ainsi clivé est soumis, dans un second temps, à une dégradation non spécifique par des exoribonucléases. En accord avec cette hypothèse, il est notable de constater que, alors que les gènes *vapBC7* sont co-transcrits dans le même opéron, leur expression dans la zone III est différente (Roux et al., 2014) : l'expression du gène de la toxine est élevée, celui de l'antitoxine reste très faible (**Figure 5x**) . Une explication possible est que la partie de l'ARNm correspondant au gène de l'antitoxine serait préférentiellement clivée par la toxine, phénomène permettant ainsi d'amplifier l'effet de la toxine, en empêchant la traduction de VapB7.

Enfin, nous avons pu observer dans des nodosités induites par le mutant *vapC7*, l'existence d'un burst en anion superoxyde associée à l'induction de la NADPH oxydase RbohF. Ainsi, la plante pourrait participer à l'éviction rapide de ce bactéroïde inefficace, due à l'invalidation de la toxine VapC7, qui permettrait une rupture de la symbiose entre les deux partenaires et conduirait à une sénescence nodositaire précoce et à une perte de rendement végétal.

- **Les mutants *vapC* présentant une fixation et un rendement végétal supérieurs de phénotype Fix⁺⁺ : *vapC5* (avec *M. sativa*) et *vapC10* (avec *M. truncatula*)**

Deux mutants *vapC* ont présenté un phénotype Fix⁺⁺ en interaction avec *Medicago sp*, c'est-à-dire une meilleure capacité de fixation d'azote (N₂) associé à un meilleur rendement végétal. Notre étude portant sur le phénotype symbiotique du mutant *vapC5* en interaction avec *M. sativa* (Lipuma et al., 2014) a permis de montrer que les nodosités induites présentaient un retard dans la mise en place du processus de sénescence, résultant en une capacité symbiotique accrue et un rendement végétal deux fois plus élevé chez cette plante d'intérêt agronomique (luzerne fourragère). Par conséquent, on peut émettre l'hypothèse que la toxine VapC5 préserve des ARNm essentiels à la symbiose, impliqués directement dans la fixation d'azote ou dans l'adaptation à la vie intracellulaire et la résistance aux stress perçus dans le symbiosome en zone III de fixation. Ces ARNm seraient dégradés chez le bactéroïde WT, participant ainsi au processus de sénescence (**Figure 5x**) .

Il serait donc intéressant de mener des analyses plus poussées dans le cas du mutant *vapC10* qui présente un phénotype Fix⁺⁺, en interaction avec *M. truncatula* : étude de viabilité du bactéroïde et recherche de marqueurs de zone III et de sénescence.

En conclusion, les phénotypes symbiotiques variés et parfois opposés des mutants *vapC* en interaction avec *Medicago sp.*, mis en évidence dans ce travail de thèse, posent la question de l'activation de ces systèmes *in vivo*. Est-ce lié à une expression différente des opérons *vapBC in planta* ? Quels sont les signaux d'induction ? Quelle est la spécificité de clivage de ces toxines VapC qui pourraient expliquer la production de populations d'ARN dégradés/préserver à l'origine d'une fonction biologique ? Quel est le rôle des protéases agissant sur les antitoxines sur le ratio Antitoxine VapB/ Toxine VapC et leur activation *in vivo* ?

C. Liens entre expression des gènes *vapBC* et phénotypes symbiotiques ?

Existe-t-il un lien entre les différents profils d'expression des gènes *vapBC* dans la nodosité et le phénotype symbiotique des mutants *vapC* correspondants *in planta* ?

Les résultats présentés dans la Partie 1 Résultats (Figure 13 et 16) montrent que les mutants *vapC2*, *vapC5* et *vapC7* ont tous les trois une efficacité fixatrice d'azote très affectée, or le profil d'expression nodositaire des gènes correspondants est très différent. Ainsi, le gène *vapC7* est essentiellement exprimé en zone III, alors que les gènes *vapC3* et *vapC5* sont quasi éteints dans cette zone mais très exprimés dans l'interzone II-III, voire dans la zone II d'infection concernant le gène *vapC2*. Inversement, les gènes *vapC3* et *vapC10*, qui ont quasiment le même profil d'expression dans la nodosité, à savoir très faiblement exprimé, ont des phénotypes mutants opposés, le premier étant Nod⁻ et le second Fix⁺⁺. Par conséquent, il n'y a pas de lien entre le profil d'expression dans la nodosité des gènes *vapC* et leur rôle symbiotique.

La compréhension des différents phénotypes est plus complexe qu'il n'y paraît et pourrait donc se situer à différents niveaux :

i) Régulation de l'expression des opérons TA par la perception de signaux différents ?

A ce jour, hormis la régulation négative assurée par le complexe TA ou par l'antitoxine en excès, qui se trouve levée, au niveau post-traductionnelle, par la dégradation de l'antitoxine par des protéases, il n'a pas été décrit de régulation transcriptionnelle directe du promoteur d'un opéron TA, via une protéine régulatrice particulière. Toutefois, on ne peut exclure que des régulations positives (activation) puissent avoir lieu dans le cas de la levée de la répression (situation où l'antitoxine est dégradée). Il suffirait pour cela d'étudier l'activité du promoteur dans différentes conditions dans un contexte où le locus sauvage est délété.

ii) Rôle de protéases spécifiques ?

Si la régulation de l'expression n'a lieu qu'au niveau post-traductionnelle, cela sous-entend que les antitoxines de ces systèmes sont dégradées par différentes protéases qui ne sont pas activées par les mêmes conditions de stress. Chez *S. meliloti*, il existe différents gènes codant des protéases putatives de type Clp, pour lesquelles aucune information n'est disponible. Par contre, un mutant dans le gène *lon*, a permis de montrer que la protéase Lon était impliquée dans la régulation de la synthèse d'exopolysaccharide (EPS) et qu'elle était nécessaire pour la formation de nodules chez *M. sativa* (Summers et al., 2000). Un mutant *lon* induit, en effet, des pseudonodules Fix⁻, ne contenant que quelques bactéroïdes. Toutefois l'impact de cette mutation sur l'expression des opérons TA n'a pas été étudié et représenterait une perspective de travail possible.

iii) Spécificité de clivage de la toxine VapC

Comme décrit dans l'introduction, les protéines VapC peuvent agir en tant qu'endoribonucléases ciblant les ARNm au niveau d'une séquence de reconnaissance spécifique. Certaines ont été décrites comme pouvant cibler l'ARNr 23S et d'autres l'ARNt initiateur N-formyl méthionine. Il est possible que les différentes VapC de *S. meliloti* présentent également des cibles ARN différentes (ARNr, ARNt, ARNm) et que celles ciblant les ARNm possèdent des sites de reconnaissance spécifiques différents générant des pools d'ARNm dégradés/préserverés de nature différente menant ainsi à une action biologique

distincte (Winther and Gerdes, 2011) (Daines et al., 2007) (Dienemann et al., 2011; Lopes et al., 2014).

Pour le savoir, il serait donc nécessaire de purifier ces toxines VapC et de réaliser des analyses *in vitro* afin de prédire leurs cibles moléculaires et leurs sites de clivage. Nous avons réalisé la purification et la caractérisation *in vitro* de l'activité toxique de la toxine VapC7. Il serait également intéressant de purifier la toxine VapC10, dont le mutant induit un phénotype Fix⁺⁺ opposé à celui du mutant *vapC7* chez *M. truncatula* (Fix^{+/-}). La comparaison des ARNm ciblés par ces deux toxines serait intéressante afin de voir si leur spécificité de clivage explique leur rôle opposé en interaction symbiotique.

D. Rôle symbiotique des systèmes VapBC dépendant de l'espèce de *Medicago* ?

Parmi les différents mutants *vapC*, l'un d'entre eux (*vapC5*), en interaction avec *M. sativa* et avec *M. truncatula*, présente un phénotype symbiotique différent, suggérant un rôle de ce système TA dépendant de la plante hôte.

Ainsi, le mutant *vapC5* présente un phénotype symbiotique amélioré (Fix⁺⁺ et sénescence nodositaire retardée) en interaction avec *M. sativa* (Lipuma et al., 2014b), alors qu'en interaction avec *M. truncatula*, ce même mutant a un phénotype inverse de type Fix^{+/-}. De même, le mutant *vapC7*, présente un phénotype de sénescence précoce et Fix^{+/-} en interaction avec *M. truncatula* mais ne présente pas de phénotype en interaction avec *M. sativa* (résultats non présentés).

Le rôle des systèmes TA de la famille VapBC pourrait ainsi être dépendant de la plante hôte. Des différences existent entre ces deux plantes, on sait notamment que l'efficacité symbiotique et plus particulièrement la capacité fixatrice d'azote est plus élevée chez *M. sativa* que chez *M. truncatula* (Suliman and Schulze, 2010). De plus, dans la littérature, des différences de phénotypes symbiotiques de mutants bactériens en interaction avec *M. sativa* ou *M. truncatula* (Niehaus et al., 1998) (Wang et al., 2007) ont été décrits. Ainsi, un mutant de synthèse du LPS (lipopolysaccharides) de *S. meliloti* ne présente pas de phénotype symbiotique en interaction avec *M. sativa*, mais présente un phénotype Fix⁻ en interaction avec *M. truncatula*. Ainsi, parmi 25 espèces de *Medicago* étudiées pour leur

capacité fixatrice d'azote, trois présentent un phénotype Fix⁻ avec la souche mutante (*lps*) et Fix⁺ avec la souche sauvage (Sm2011). Dans cette étude, la présence d'un LPS fonctionnel est donc un élément essentiel pour l'interaction avec *M. truncatula* (Niehaus et al., 1998).

Les différences de comportements symbiotiques de mutants bactériens sur les deux espèces modèles pourraient donc s'expliquer par des mécanismes de défense/de reconnaissance de la bactérie différents. Dans ce contexte, le rôle joué par certains systèmes TA serait donc important. Il est également possible que des facteurs végétaux propres à chacune des deux espèces de *Medicago* (peptides NCR, autres facteurs,...) jouent un rôle dans l'activation des systèmes TA et expliquent les différences phénotypiques.

Une perspective consistera donc à étudier le phénotype symbiotique de tous les mutants *vapC* générés dans ce travail de thèse, en interaction avec *M. sativa*, voire avec d'autres espèces de *Medicago*. Ceci permettra de savoir si les phénotypes observés peuvent être extrapolés à d'autres espèces ou de répondre à la question de la spécificité d'hôte dans le cas où d'autres variations phénotypiques seraient observées. Ce projet permettra d'évaluer le rôle des systèmes TA dans la reconnaissance de sa plante hôte.

E. Analogie avec le rôle des systèmes VapBC de bactéries pathogènes humaines

Récemment, le rôle des systèmes VapBC en tant que facteurs de virulence et/ou dans la survie des bactéries dans une cellule hôte eucaryote a été rapporté pour des bactéries pathogènes qui ont des modes de vie variables (libre ou en interaction lors de l'infection) et s'adaptent donc à différents environnements (Audoly et al., 2011; Frampton et al., 2012; Ren et al., 2012; Helaine et al., 2014). Ces observations, couplées au fait que ces systèmes soient rares ou absents dans les génomes de bactéries symbiotiques ou pathogènes strictes qui vivent dans un environnement donné (Pandey and Gerdes, 2005b; Ogier et al., 2014) permettent de proposer que ces systèmes TA jouent un rôle majeur dans l'adaptation de la bactérie à des changements environnementaux et en particulier dans l'adaptation à la vie dans une cellule hôte eucaryote. C'est le cas du mutant *vapC7* de *S. meliloti* qui n'est pas apte à survivre dans la cellule végétale, ce qui suggère également un rôle du module VapBC7 dans la survie intracellulaire de la bactérie symbiotique.

De manière intéressante, des études récentes concernant des bactéries pathogènes humaines, proposent que les systèmes TA ne joueraient pas seulement un rôle dans l'adaptation de la bactérie à sa vie intracellulaire, mais que ces systèmes agiraient également sur des cibles eucaryotes. Cela pose la question du passage de ces toxines de systèmes TA dans le cytosol de la cellule eucaryote. En effet, les toxines décrites ne possèdent pas de peptide signal permettant leur translocation membranaire, et la sécrétion de toxines de système TA n'avait pas été décrite jusqu'à une étude récente réalisée chez *Pseudomonas*. Chez *Pseudomonas sp.*, l'analyse du sécrétome de mutants altérés dans un système de sécrétion de type VI a permis d'identifier trois effecteurs de ce système de sécrétion, dont la toxine Tse2 codée par un système TA putatif de la famille VapBC (Hood et al., 2010). La démonstration de la toxicité de Tse2 a été montrée chez *P. aeruginosa* et cet effet peut être annulé par la co-expression de cette toxine avec son antitoxine Tsi2. L'expression de cette toxine dans un vecteur d'expression inductible chez *Saccharomyces cerevisiae* a un effet létal sur cette cellule eucaryote. Toutefois, la translocation de cette toxine par le système de type VI directement dans le cytoplasme de la cellule eucaryote n'a pas encore été démontrée. Un autre exemple de rôle possible des toxines TA sur la cellule eucaryote concerne la bactérie pathogène *Leptospira interrogans*. Chez cette bactérie, trois systèmes TA ont été mis en évidence (ChpIK, MazEF et VapBC) et l'étude réalisée par Komi et coll. (Komi et al., 2015) a permis de montrer que la transfection des toxines ChpK et MazF entraînait la mort des cellules THP-1 en culture, suggérant ainsi que ces toxines soient également capables de cibler des fonctions essentielles des cellules eucaryotes.

Dans notre modèle biologique *Medicago sp. - S. meliloti*, une des questions que nous nous sommes posées durant le travail de thèse était de savoir si les toxines des systèmes VapBC pouvaient jouer un rôle dans l'entrée en sénescence de la cellule végétale dans la nodosité. En effet, sachant que la première étape du processus de sénescence est la dégradation du bactéroïde, qui précède celle de la cellule eucaryote qui l'héberge, et sachant que la toxine est stable, il est alors possible d'envisager que la libération de celle-ci dans le cytosol de la cellule végétale pourrait contribuer à sa dégradation.

Pour tester cette hypothèse, nous avons réalisé deux expériences préliminaires non montrées dans le manuscrit de thèse et décrites ci-dessous :

i) Transformation transitoire de feuilles de tabac par agro-infiltration grâce à des *Agrobacterium tumefaciens* recombinants contenant le gène de la toxine VapC7.

Le but de cette approche était d'observer si la surexpression de la toxine pouvait entraîner une réponse de type nécrose visible sur feuille de tabac. Malheureusement, cette

expérience n'a pas donné de résultats positifs. Toutefois, en l'absence de moyen de détection, la présence réelle de la protéine VapC7 fonctionnelle dans les cellules de feuille de tabac n'a pu être confirmée et seule la transcription du gène *vapC7* avait pu être vérifiée. Récemment, nous avons obtenu, chez le lapin, des anticorps polyclonaux dirigés contre cette toxine. Il pourrait donc être intéressant de reproduire l'expérience de transformation et de vérifier la présence de la protéine VapC7 pour conclure. Une autre possibilité serait de transférer le plasmide recombinant portant le gène *vapC7* chez *Agrobacterium rhizogenes* afin de réaliser une transformation de racines de *Medicago truncatula*.

ii) Dégradation d'ARN ribosomaux de *Medicago truncatula* par VapC7 ?

Grâce à la purification de la toxine VapC7, nous avons réalisé des expériences préliminaires pour tester la capacité de cette toxine de *S. meliloti* à dégrader, *in vitro*, les ARN ribosomaux extraits de *M. truncatula*. Les résultats obtenus, à reproduire, montrent que dans un test d'activité RNase, la toxine VapC7 purifiée est capable de dégrader les ARNr de *M. truncatula* présents dans un extrait d'ARN totaux.

Ces résultats encourageants montrent que VapC7 est capable de cibler des ARN du partenaire végétal. Grâce à l'obtention récente d'anticorps dirigés contre VapC7, une perspective de ce travail de thèse sera maintenant de suivre, par immunolocalisation, la présence de la protéine *in planta* au cours de l'infection et dans les différentes zones de la nodosité. Ainsi, sa présence dans le cytosol végétal de cellules en cours de sénescence dans la zone IV sera recherchée.

En conclusion, l'hypothèse du rôle de certaines toxines VapC sur l'hôte eucaryote dans la nodosité reste une question intéressante à démontrer pour mieux comprendre l'implication du partenaire bactérien dans la mise en place du processus symbiotique. Rappelons que, de façon intéressante, dans l'analyse de l'environnement génétique des opérons codant des systèmes TA, nous avons pu voir pour l'un d'entre eux (*vapBC3*), qu'il se trouve proche de gènes codant des protéines d'un système d'export putatif de type « multidrug ».

II. Rôle de l'antitoxine

La toxine n'est pas la seule composante essentielle dans le rôle biologique joué par les systèmes TA car ces systèmes agissent en tant que module dans lequel l'antitoxine joue un

rôle majeur. En effet, le ratio A/T est primordial dans la régulation de l'expression des opérons TA, de même que le niveau de dégradation de l'antitoxine par des protéases de l'hôte activées. Des signaux perçus par la bactérie vont impacter ces deux éléments et déplacer l'équilibre en faveur d'un excès de toxine par rapport à l'antitoxine. La toxine, libérée de l'antitoxine, sera donc libre d'agir sur ses cibles et d'induire une réponse biologique.

En effet, nous avons montré qu'un mutant de délétion de l'opéron complet *vapBC5* ne présente pas de phénotype symbiotique, suggérant un rôle de l'antitoxine dans le phénotype observé chez le mutant *vapC5*. En effet dans nos mutants *vapC*, non seulement la toxine est tronquée et donc non fonctionnelle mais également l'antitoxine est présente, libérée de sa toxine, et puisque le complexe TA ne se forme pas, il y a diminution de l'autorégulation négative de l'expression de l'opéron et donc potentiellement surproduction d'antitoxine.

Notre stratégie d'étude du rôle symbiotique des systèmes VapBC a été basée sur l'analyse de mutants *vapC* (A⁺/T⁻) et non de mutants de délétion de l'opéron complet (Δ AT). Ces mutants sont donc invalidés pour la toxine mais produisent l'antitoxine, et comme explicité ci-dessus, ils peuvent même surexprimer et surproduire l'antitoxine (A⁺⁺⁺T⁻), du fait de la perte de régulation négative de l'opéron. Des expériences de RT-qPCR pourraient être réalisées pour vérifier cette perte d'autorégulation et la surexpression de *vapB* dans toutes les souches mutantes *vapC* générées dans ce travail de thèse. Cette perte d'autorégulation a pu être démontrée à l'aide de dosages d'activité β -galactosidase réalisés sur des cultures bactériennes de souches WT et mutantes *vapC5* ou *vapC7*, contenant le plasmide pEP82 (Elo et al., 1998) portant le gène rapporteur *lacZ* sous le contrôle du promoteur *vapBC5* ou *vapBC7* (Partie 2 Résultats (Lipuma et al., 2014) et Partie 3 Résultats).

Ainsi, il n'est pas exclu que le phénotype observé chez les mutants *vapC*, ne soit pas uniquement dû à l'absence de la toxine, mais soit également le résultat de la surproduction de l'antitoxine. En effet, alors qu'il avait été préalablement admis que seule l'antitoxine d'un système pouvait interagir avec « sa » toxine, ce concept a été récemment remis en cause. En effet, une communication croisée entre 2 systèmes TA différents a pu être démontrée soit au niveau protéine-protéine, soit au niveau de la régulation transcriptionnelle par la fixation de l'antitoxine sur une autre région promotrice que celle de son propre opéron (Yang et al., 2010; Kasari et al., 2013).

Nos travaux sur l'opéron *vapBC5* ont montré que l'antitoxine doit jouer un rôle dans le phénotype du mutant *vapC5* (Lipuma et al., 2014). En effet, le mutant de délétion de tout l'opéron ne présente aucun phénotype symbiotique alors que le mutant *vapC5* (*vapB5+++vapC5-*) présente un retard de sénescence nodositaire et une capacité fixatrice d'azote supérieure. Ceci suggère un rôle pour l'antitoxine *VapB5* (famille *AbrB*) dans ce contexte, comme expliqué dans la Figure S2 (partie 2 Discussion de l'article *VapC5*). Afin de confirmer le rôle joué par l'antitoxine dans les systèmes *VapBC* et plus précisément pour le module *VapBC5*, il serait intéressant de voir si cette antitoxine peut réaliser des interactions croisées avec d'autres toxines. Par exemple, chez *E. coli*, des tests de toxicité pourraient être réalisés en co-surexprimant le gène d'une toxine *VapC* d'un système TA donné porté par un plasmide, avec le gène codant pour l'antitoxine d'un autre système TA (gène *vapB5* notamment) porté par un autre plasmide. Ainsi, la capacité de *VapB5* à contrer l'effet toxique de certaines *VapC* permettrait de démontrer qu'un complexe protéique *VapB5-VapCx* a lieu. Ces tests pourraient, dans un premier temps, être réalisés avec le gène *vapB5* (famille *AbrB*) avec des gènes de toxine *VapC*, associés dans leur module, à des gènes codant des antitoxines de la famille *AbrB*. Il serait notamment intéressant de savoir si la toxine *VapC7* est capable de former un complexe avec l'antitoxine *VapB5*, car l'antitoxine *VapB7* est, chez *S. meliloti*, la plus proche au niveau homologie de séquence, avec la toxine *VapB5* (Figure S2 Article en préparation Partie 3 des résultats).

Une autre stratégie, complémentaire à celle proposée ci-dessus, serait de surexprimer l'antitoxine *VapB5* dans une souche WT de *S. meliloti* et d'étudier les conséquences de cette surexpression sur le phénotype symbiotique.

Enfin, des tests d'interaction *in vitro* pourraient être envisagés, en incubant la toxine *VapC7* purifiée et l'antitoxine *VapB5* (à purifier ou présente dans un extrait brut). L'interaction pourrait être visualisée par Western blot à l'aide des anticorps anti *VapC7* après électrophorèse en gel non dénaturant.

III. Intérêt agronomique des systèmes TA

Comme cela a été discuté en introduction de ce mémoire de thèse (Introduction Symbiose), il y a une réelle volonté sociétale et politique à produire de manière optimisée des plantes d'intérêt agronomique. Ainsi, le plan gouvernemental *Ecophyto*, qui est reconduit à 2025, comporte

plusieurs principes : maintenir le cap d'une réduction de 50% des pesticides selon une trajectoire en deux temps, une inscription au cœur du projet agro-écologique, l'entreprise au centre du dispositif. L'enjeu est donc de produire plus, du fait de l'augmentation de la population, sans avoir plus de surfaces arables disponibles et en réduisant l'ajout d'engrais et pesticides. En déclin en Europe depuis les années 80, les légumineuses justifient un regain d'intérêt du fait de leurs atouts agronomiques, en particulier, leur contribution à l'alimentation azotée des cultures. La culture de légumineuses en co-culture avec des espèces céréalières, par exemple, permettrait de limiter l'ajout d'engrais azotés sur les cultures de céréales qui en sont de grandes consommatrices. C'est une méthode déjà utilisée actuellement. Une voie prometteuse consiste à cultiver le pois (*Pisum sativum*) en association avec une céréale, le blé par exemple (pois et blé sont alors semés et récoltés en même temps). Les rendements sont plus élevés (grâce à une meilleure utilisation des ressources) et la teneur en protéines des grains de blé augmente, alors même que les besoins en engrais azoté sont très réduits, et que les reliquats d'azote dans le sol, après récolte, sont plus faibles que pour un pois pur. Cependant, comme cité en introduction, la symbiose fixatrice d'azote ne suffit pas toujours à couvrir la totalité des besoins en azote de ces plantes, il y a donc un réel intérêt à proposer des couples fixateurs *Rhizobium*-Légumineuses plus efficaces, en réduisant notamment l'apparition de la rupture symbiotique.

En effet, notre étude sur le module VapBC5 (Lipuma et al., 2014) s'inscrit totalement dans cette approche visant à retarder la sénescence nodositaire, en proposant une bactérie génétiquement modifiée (mutant vapC5) qui entraîne une meilleure fixation d'azote et un meilleur rendement végétal, en interaction avec une plante d'intérêt agronomique, la luzerne.

Ainsi, une voie prometteuse de nos travaux, consisterait à invalider les toxines de systèmes TA de *Rhizobia* interagissant avec des légumineuses d'intérêt agronomique, par exemple de la bactérie *Rhizobium leguminosarum*, partenaire du pois *Pisum sativum*, afin d'évaluer si la mutation du gène d'une toxine d'un système TA entraîne une augmentation du rendement végétal, associée éventuellement à un retard dans l'entrée de la sénescence nodositaire.

IV. Evolution et systèmes TA

Ces travaux de thèse, novateurs dans l'étude du rôle des systèmes TA chez une bactérie symbiotique, ont permis de démarrer une collaboration avec le groupe d'Alessandra Salvioli et Paola Bonfante de l'Université de Turin, afin d'étudier les systèmes TA présents chez la bactérie endosymbiotique obligatoire d'un champignon mycorhizien.

Comme décrit dans l'introduction bibliographique, les mycorhizes arbusculaires (AM) sont capables de réaliser une symbiose avec les plantes. Ces champignons, contiennent des bactéries symbiotiques mises en évidence par des observations microscopiques, confirmées à la suite d'études omiques (Salvioli et al., 2008; Bonfante and Anca, 2009; Desiro et al., 2014). Le rôle de ces bactéries symbiotiques comme troisième partenaire dans cette interaction est aujourd'hui encore à l'étude. L'équipe du Pr P. Bonfante a ainsi mis en évidence la présence d'une bactérie endosymbiotique *Candidatus glomeribacter gigasporarum*, dans les spores de *Gigaspora margarita*, un AM. Cette bactérie est phylogénétiquement proche des *Burkholderia*, bactéries symbiotiques d'insectes notamment, ou présentes dans le sol. Le génome de *Candidatus G. gigasporarum* a été séquencé et montre, de façon surprenante pour une bactérie symbiotique obligatoire, la présence de quatre opérons putatifs (2 ChpAR, 1 YoeB-YefM et 1 RelBE) codant des systèmes Toxine Antitoxine dont deux sont complets (Toxine et Antitoxine) et exprimés (**Figure 10**). Nous avons cherché à démontrer la fonctionnalité de deux de ces modules TA (l'un de la famille ChpSB et l'autre de la famille YoeB-YefM) chez *E. coli* (test de toxicité). D'autre part, le Dr A. Salvioli a déterminé les profils d'expression de ces opérons TA en fonction du stade de l'interaction symbiotique du champignon avec sa plante hôte. Nous avons pu montrer que l'expression du module YoeB-YefM dans la bactérie symbiotique du champignon était différentes en fonction des stades de développement du champignon, l'opéron codant ce système TA était induit dans les conditions symbiotiques du champignon mycorhizien par rapport à des conditions non symbiotiques (résultats non présentés). Pour démontrer la fonction de ces deux systèmes TA, en parallèle à mon travail de thèse, les gènes codant les toxines YoeB et ChpS ont été clonés dans un vecteur d'expression inductible à l'arabinose et les plasmides recombinants introduits chez *E. coli*. Les tests de viabilité réalisés après induction à l'arabinose ont permis de montrer que la surexpression de la toxine YoeB induisait une perte rapide de la viabilité bactérienne, démontrant ainsi pour la première fois, la fonction d'un gène de cette bactérie. Des expériences visant à co-surexprimer les

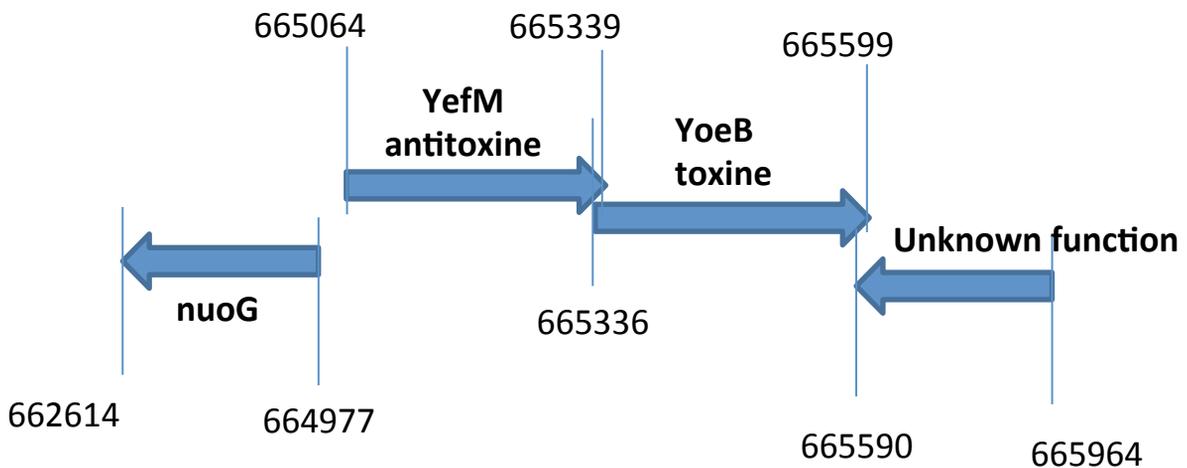
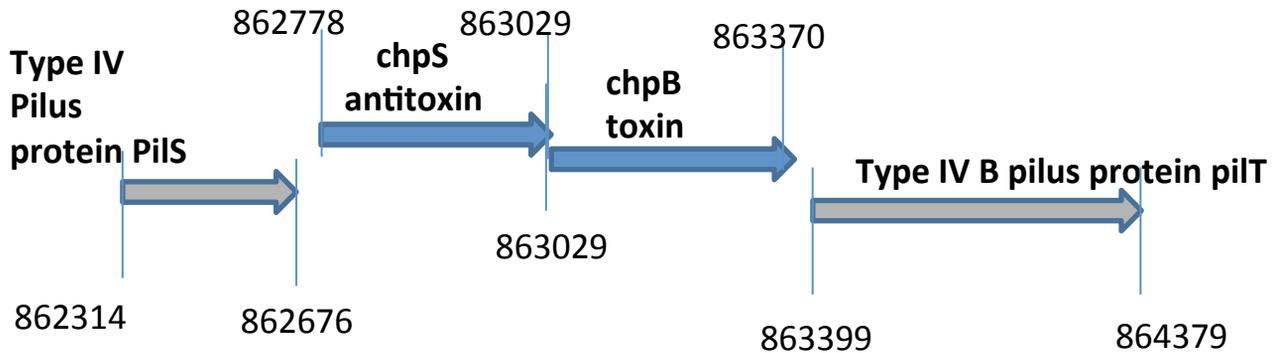


Figure 60 : Deux systèmes TA dans le génome de *Candidatus gigaspora margarita*

Organisation génétique des régions portant les opérons toxine-antitoxine putatifs de la bactérie endosymbiotique *Candidatus gigaspora margarita*. Génome disponible sur la plateforme MaGe.

gènes de la toxine (YoeB) et de l'antitoxine (YefM) doivent être réalisés pour valider la fonction du module. Un tel effet toxique n'a pas pu être démontré dans le cas de la surexpression du gène *chpB* du second module TA étudié (ChpSB) (résultats non présentés).

Ces travaux sont ainsi les premiers à démontrer la présence de systèmes TA fonctionnels chez une bactérie symbiotique obligatoire. Et des analyses des génomes sont en cours afin de déterminer si ces modules se situent dans une zone conservée parmi les différentes espèces de *Burkholderia* symbiotiques obligatoires ou non, et si ces espèces possèdent des systèmes TA dans leur génome.

En conclusion, ce travail de thèse a permis d'apporter de nouvelles connaissances sur la compréhension du rôle des systèmes TA bactériens et de confirmer le rôle actif de la bactérie dans l'efficacité, le maintien puis la rupture de la symbiose fixatrice d'azote. Nos résultats permettent également de valider le concept selon lequel retarder l'apparition de la sénescence nodositaire (ici avec des mutants bactériens affectés dans des toxines VapC de systèmes TA), permet une meilleure fixation d'azote et un rendement végétal supérieur. La recherche d'un couple fixateur plante/bactérie plus efficace présente un enjeu agro-écologique important. Des questions restent encore en suspens comme notamment la détermination des cibles moléculaires de ces toxines *in vitro* et *in vivo*, de même que la nature des signaux permettant l'activation de ces modules TA. Enfin, nous avons montré la présence de systèmes TA fonctionnels dans le cas d'une bactérie endosymbiotique obligatoire d'un champignon mycorhizien, alors même que ce type d'opérons TA était décrit dans la littérature comme absent des génomes de bactéries intracellulaires obligatoires, suggérant de nouvelles perspectives sur le rôle de ces systèmes.

MATERIELS ET METHODES

I. Matériels biologiques

A. Production de matériel végétal

Les plantes ont été produites en chambre de culture dans un environnement contrôlé. Les plantes sont ainsi mises en chambre climatisée dont l'éclairage est assuré par des tubes fluorescents assurant une énergie lumineuse $360 \mu\text{M m}^{-2} \text{s}^{-1}$. La photopériode est de 16 h de lumière et de 8 h d'obscurité. La température est de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ pendant l'héméropériode et de $18 \pm 1^\circ\text{C}$ pendant la nyctipériode. L'humidité relative est de $60 \pm 5\%$.

Les plants de *Medicago sativa* ont été cultivés en vermiculite et inoculés avec une culture bactérienne de *Sinorhizobium meliloti* ($\text{DO}_{600\text{nm}} = 0,1$), 3 jours après semis.

Les plants de *Medicago truncatula*, ont été cultivés en pots avec du sable fin de type B5. Les graines de *Medicago truncatula* écotype A17 sont plongées dans l'acide sulfurique (H_2SO_4) pendant 5 min afin de lever la dormance tégumentaire, puis sont rincées 3 à 5 fois avec de l'eau distillée. Elles sont ensuite stérilisées par un bain d'hypochlorite de sodium 1,2 % de 3 min. Enfin, elles sont rincées 3 à 5 fois avec de l'eau distillée stérile. Les graines sont mises à germer sur agarose 0,5% pendant deux jours à 16°C . Cinq jours après le repiquage dans le sable, les plantules sont inoculées avec une culture de *Sinorhizobium meliloti* ($\text{DO}_{600\text{nm}} = 0,05$).

Le matériel végétal est récolté pour les différentes manipulations entre 28 et 42 jours post-inoculation.

B. Cultures bactériennes

Les souches d'*Escherichia coli* ont été cultivées à 37°C en milieu Luria-Bertani (LB) et les souches de *S. meliloti* en milieu LB supplémenté de 2.5 mM MgSO_4 et 2.5 mM CaCl_2 (LB_{MC}).

Les antibiotiques pour la sélection d'*E. coli* sont les suivants: ampicilline, $100 \mu\text{g ml}^{-1}$; chloramphenicol, $10 \mu\text{g ml}^{-1}$; streptomycine, $100 \mu\text{g ml}^{-1}$; tétracycline, $10 \mu\text{g ml}^{-1}$. Pour la sélection des souches de *S. meliloti*, les antibiotiques utilisés sont: streptomycine, $200 \mu\text{g ml}^{-1}$; néomycine, $200 \mu\text{g ml}^{-1}$; tétracycline, $20 \mu\text{g ml}^{-1}$.

Les différentes souches bactériennes utilisées sont indiquées dans la table des souches (tableau 10).

II. Mesure de la capacité fixatrice d'azote des plantes et du rendement végétal :

A. La capacité fixatrice d'azote

La capacité fixatrice d'azote des racines nodulées de *Medicago* sp. est déterminée par une méthode indirecte, qui exploite l'aptitude de la nitrogénase à réduire l'acétylène (C_2H_2) en éthylène (C_2H_4). L'activité réductrice d'acétylène (ARA) des plantes nodulées est mesurée par chromatographie en phase gazeuse (ATI-Unicam, model 610, Cambridge, UK) équipée d'une colonne Porapak T (Bekki et al. 1987), à 80°C, afin de mesurer la quantité d'éthylène formé (Hardy et al. 1968). Les mesures sont réalisées à partir de 15 plantes réparties en 5 piluliers de 30 ml incubés à 26°C. Les piluliers contenant les parties racinaires des plantes sont hermétiquement fermés, 3 ml d'air contenu dans les piluliers sont prélevés et remplacés par un volume équivalent d'acétylène pur, représentant une concentration finale de 10%. Après incubation (30 et 60 min), 200 μ l de la phase gazeuse sont injectés dans le chromatographe. La séparation de l'éthylène et de l'acétylène est effectuée sur colonne de résine, le gaz vecteur est l'azote et la détection est assurée par un détecteur à ionisation de flamme relié à un enregistreur intégrateur. Les résultats d'activité fixatrice d'azote sont exprimés en nmoles d'éthylène formées/heures/plante.

B. Mesure du rendement végétal :

Afin de déterminer l'effet des mutants bactériens sur le rendement végétal, des mesures de poids frais et de taille des parties aériennes sont réalisées. 30 plantes sont sacrifiées à 6 semaines post-inoculation pour réaliser ces mesures.

III. Techniques d'histologie

A. Ultrastructure des nodosités : protocole de Technovit

Pour réaliser l'analyse de l'ultrastructure des nodosités, les nodosités sont fixées et incluses dans une résine pour pouvoir réaliser des coupes très fines de nodosité et observer ainsi de manière précise la structure des cellules végétales et des symbiosomes dans la nodosité. Dix nodosités en moyenne sont prélevées à 3 ou 6 semaines post inoculation. Elles sont ensuite fixées dans un mélange de glutaraldéhyde 25% et formaldéhyde 37% dans du Tampon phosphate pH 7,2 durant 30 min sous vide. Après des étapes de déshydratation successives à différentes concentration d'éthanol sous agitation à 4°C, les nodosités sont immergées dans une solution, moitié Technovit 7100 et moitié éthanol 100%, durant une nuit à 4°C. Ensuite les nodosités sont incubées dans une solution Hardener I et Technovit 7100 durant 2 heures puis dans un mélange de solution Hardener II et Technovit 7100 pour polymériser la résine. Les blocs de résine contenant les nodosités sont ensuite découpés en coupes de 5µm à l'aide d'un microtome. Ces coupes sont colorées au bleu de toluidine pour permettre une meilleure visualisation des structures cellulaires.

Ces coupes colorées sont observées au microscope après fixation entre lame et lamelle au DPX (mélange de distyrène, tricresyl phosphate et xylène; VWR international S.A.S Fontenay sous Bois, France). Le microscope utilisé est un imager Z.1 (Zeiss, Le Pecq, France) couplé à une caméra AxioCam MRm (Zeiss, Le Pecq, France).

B. Mesure de la viabilité des bactéroïdes *in vivo* en utilisant la sonde LiveDead

Cinq nodosités de 3 semaines post-inoculation sont prélevées sur des plantes inoculées avec différentes souches bactériennes. Les nodosités sont incluses dans une solution d'agarose 4%. Des coupes de 80 µm sont réalisées en utilisant un vibratome. Ces coupes sont ensuite incubées 30min dans une solution de Tampon phosphate contenant 5mM de Syto9 et 30mM de iodure de propidium (Live/Dead BacLight™, invitrogen). Les coupes sont ensuite retirées de la solution et montées sous lame et lamelle avec de l'eau pour réaliser les observations microscopiques. Le microscope utilisé est le microscope confocal Zeiss

(LSM510 META). Les conditions de détection sont décrites dans l'article de Haag et al. (2011)

C. Mesure de l'accumulation d'anion superoxide dans la nodosité par la coloration au Nitrobleu Tétrazolium (NBT)

La détection de l'anion superoxide ($O_2^{\cdot-}$) dans la nodosité est réalisée grâce à l'utilisation de Nitrobleu Tétrazolium (NBT). Les nodosités sont incluses dans de l'agarose 4% et des coupes de 80 μ M sont réalisées au vibratome. Les coupes sont incubées dans une solution de marquage composé de 1mM NBT dans un tampon phosphate 10mM pH 7,8 pendant 20 min à 37°C. La réaction de marquage est stoppée en rinçant les coupes trois fois à l'éthanol absolu. Finalement, le marquage au NBT est visualisé sur les échantillons à l'aide du microscope Zeiss Axioplan 1. Un contrôle négatif est utilisé en utilisant un marquage au Diphenylène Iodonium (DPI) qui est un inhibiteur des NADPH oxydases.

D. Mesure de l'endoreduplication des bactéroïdes et des cellules de plantes dans la nodosité par cytométrie en flux.

Vingt plantes de *Medicago truncatula* sont récoltées 3 semaines après l'inoculation. Les nodosités sont écrasées dans 5ml de tampon phosphate 50mM pH 7,5. Après filtration sur gaze, deux centrifugations successives une de 400g 5min 4°C, puis 2500g 10min à 4°C, permettent de se débarrasser premièrement des débris cellulaires (1^{ere} centrifugation), puis de culoter et récupérer les bactéroïdes (2^{ème} centrifugation). Le culot de bactéroïdes est resuspendu dans 1ml de PBS filtré et autoclavé. Du fluorochrome 4',6'-diamidino-2-phénylindole (DAPI) à 50 μ g/ml est ajouté au tampon PBS. Les analyses au cytomètre de flux sont réalisées à la plateforme de l'Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire à Sophia-Antipolis.

Pour analyser l'endoreduplication des cellules végétales, les noyaux sont extraits de plantes sacrifiées après 3 semaines d'inoculation. Les noyaux issus de cellules de feuilles, de racines et de nodosités sont extraits après découpage des tissus au rasoir. Les échantillons sont resuspendus dans du tampon Galbraith (Galbraith et al., 1983). Après filtration sur gaze, les

noyaux sont marqués avec du Propidium Iodide à 1mg/ml et analysés par cytométrie de flux.

IV. Techniques de biologie moléculaire

A. Amplification d'ADN par PCR

Le mélange réactionnel contient 200 ng d'ADN génomique ou d'ADN plasmidique linéarisé, 50 pmol de chacune des deux amorces, 100 pM de chaque dNTPs (dATP, dTTP, dCTP et dGTP), du tampon Taq polymérase 1x et 0,2 U/ μ l de Taq polymérase, le tout dans un volume final de 50 μ l. L'ADN est ensuite amplifié grâce à un thermocycleur (BiometraTgradient) selon le schéma suivant : 5 min de dénaturation à 95°C, puis 35 cycles comprenant, 1 min à 95°C, 1 min à 60°C (température d'hybridation des amorces) et 1 min à 72°C. La PCR est terminée par 5 min d'élongation à 72°C.

B. Analyse d'expression de marqueurs moléculaires sur nodosités par mesure qPCR

Environ 100 mg de nodosités sont utilisés pour l'extraction d'ARN totaux. Pour réaliser certaines expériences, les nodosités ont été coupées en deux pour séparer la partie fixatrice de la nodosité, de la partie sénescence. Les ARN totaux sont alors extraits des deux parties. Les ARN totaux sont extraits de nodosité par un protocole au Trizol (Invitrogen life technologies). Un traitement à la DNase (TURBO DNase, life technologie) est réalisé afin d'éliminer toute trace d'ADN génomique avant la transcription inverse. L'étape de transcription inverse des ARN en ADNc est réalisée en utilisant 500ng d'ARN totaux, un mélange d'oligo dT et d'amorces aléatoires (TAKARA RT Kit). La qPCR est réalisée avec un Opticon 2 à système de fluorescence continu de détection (MJ Research, Bio-Rad, Marnes-la-coquette, France) en utilisant comme agent intercalant le sybergreen et en suivant le protocole du kit de qPCR GO Taq (Promega). Dans chaque réaction, on utilise 5 μ L d'ADNc dilué au 100^{ème} et 0,3 μ M des deux d'amorces. Les conditions de PCR sont les suivantes : 95°C pendant 10min, puis durant 39 cycles 95°C 15 sec et 60°C pendant 1 min. Les données sont quantifiées avec le moniteur opticon 2 (MJ research). Deux gènes constitutifs sont utilisés pour normaliser l'expression des gènes analysés. Le choix de ces gènes se fait par Genorm parmi cinq gènes au choix.

C. Construction des souches mutantes VapC : stratégie de clonage et méthode

Pour réaliser des mutants d'inactivation dans les gènes codants les toxines VapC, car non disponibles dans les banques de mutants, une stratégie commune a été utilisée. Un fragment interne d'environ 150 pb de chaque gène *vapC* à invalider a été amplifié par PCR. Les oligonucléotides utilisés (**Tableau 11**) ont été définis en utilisant le software Primer 3 et le logiciel Snapgene pour visualiser le résultat de l'amplification. Les produits PCR obtenus ont été clonés dans le vecteur pGEM-T (Promega). Après vérification des fragments d'ADN par séquençage, les fragments ont été insérés dans le vecteur suicide mobilisable pK19mob2ΩHMB (Luo et al., 2005) par ligation. Les vecteurs recombinants contenant le fragment interne de la toxine ont été introduits dans la souche DH5α *d'E. coli* par électroporation, puis transférés par conjugaison triparentale dans la souche sauvage 2011 de *S. meliloti* pour permettre l'évènement de recombinaison et l'inactivation du gène cible. Pour vérifier l'insertion du plasmide dans le gène cible, des PCR sont réalisées en utilisant des amorces permettant l'amplification de fragments jonction (**Figure 52**).

D. Tests de toxicité chez *E. coli*

Les toxines et antitoxines VapB5, VapC5, VapB7, VapC7, ainsi que les modules TA entiers, ont été clonés dans le vecteur d'expression inductible à l'arabinose pBAD24 (Guzman et al., 1995) afin de tester leur effet sur la viabilité chez *E. coli* (Lipuma et al, 2014, et section « Material and Methods », Article en préparation Partie 2 Résultats, ce manuscrit).

Pour démontrer la toxicité des toxines VapC5 et VapC7, les souches *d'E. coli* contenant ces plasmides recombinants ont été cultivées à 37°C en milieu LB et 1 à 2% d'arabinose ont été rajoutés pendant 4h pour induire l'expression des gènes. La viabilité a été suivie par dénombrement sur milieu gélosé LB et/ou par cinétique de croissance.

V. Techniques de microbiologie

A. Préparation de cellules thermo-compétentes et transformation.

Les souches d'*E. coli* thermo-compétentes sont préparées à partir de 200 ml de culture à $DO_{600nm} = 0,3$. Les bactéries sont centrifugées pendant 10 min, à 4°C et à 5000 rpm, et le culot est lavé avec 25 ml de tampon TRIS-HCl pH 7,5 à 10 mM. Après une autre centrifugation de 10 min dans les mêmes conditions, le culot est repris dans 25 ml de $CaCl_2$ à 10 mM, et est conservé pendant 1 h dans la glace. Une dernière centrifugation est effectuée avant de reprendre les bactéries dans une solution de $CaCl_2$ 10 mM et glycérol 20 %. Les bactéries compétentes sont aliquotées et conservées à -80°C jusqu'à leur utilisation. Pour la transformation, 100 μ L de cellules sont ajoutées à 1 à 5 μ L d'ADN et placés dans la glace pendant 30min. Puis les cellules avec l'ADN, sont mises à 42°C pendant 45 secondes et remis dans la glace pendant 2min. Un volume de 400 μ L de SOD est ajouté et les bactéries mises en culture sous agitation 1H à 37°C.

B. Conjugaison triparentale

La conjugaison triparentale, utilisée pour le transfert de plasmides d'une souche d'*E. coli* vers une souche de *S. meliloti*, a été décrite par Ditta et al., 1980. Elle fait intervenir trois partenaires : Une souche donneuse d'*E. coli*, contenant le gène d'intérêt cloné dans un plasmide suicide pour *S. meliloti*, une souche auxiliaire d'*E. coli* contenant le plasmide pRK600, plasmide nécessaire à la mobilisation en *trans* du plasmide de la souche donneuse, et une souche receveuse de *S. meliloti* présentant en général une résistance à un antibiotique permettant la sélection des exconjugants. Après 16 h de culture en milieu riche, la conjugaison est obtenue par mélange de 20 μ l de chacune des trois souches sur filtres de nitrocellulose (0,45 μ m) placé sur un milieu LB/agar et incubé 24 h à 30°C. Les filtres sont ensuite introduits dans 1 ml de LB et les cellules remises en suspension sont ensuite déposées sur boîte LBmc contenant le milieu de sélection pour les exconjugants.

C. Analyse de l'expression des opérons *vapBC5* et *vapBC7*

Les régions promotrice des modules *vapBC5* et *vapBC7* ont été clonées en amont du gène rapporteur *lacZ* (voir tableau de souches 9). Ces plasmides ont été utilisés pour transformer

une souche sauvage de *S. meliloti* et les souches mutantes pour les toxines VapC7 ou VapC5. Des mesures d'activité β -galactosidase ont été réalisées sur des cultures liquides de ces souches. La densité optique des croissances bactériennes a été prise durant la phase de croissance exponentielle ($DO_{600nm} = 0,7-0,9$). Aux temps donnés, après resuspension du culot bactérien dans 50 ou 500 μ L de tampon Z ($Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ 60mM ; NaH_2PO_4 40mM ; KCl 10mM ; $MgSO_4$ 1mM ; β -mércaptoéthanol 50mM ; BSA 1mg/ml), 20 μ L de SDS, 2 μ L de CH_3CL sont ajoutés afin de perméabiliser les cellules. Après 5 min d'incubation à 28°C, 200 μ L d'orthonitrophényl- β -galactopyranoside (ONPG) (à 4mg/ml dans du tampon phosphate) sont ajoutés. La réaction est arrêtée par ajout de 250 μ L de Na_2CO_3 2M, t minutes après l'addition de l'ONPG. La mesure des DO_{420nm} est réalisée, elle correspond à l'absorbance de l'orthonitrophénol. Les DO_{420nm} ont été utilisées pour calculer l'activité β galactosidase par la méthode de Miller. Activité β -galactosidase (Unité Miller) = $((DO_{420nm} * 1000) / (t_{min} * V * DO_{600nm}))$ Les activités Miller dans un contexte sauvage et mutant ont ainsi pu être comparées et déterminées afin de mettre en évidence ou non l'autorégulation de l'opéron *vapBC*.

VI. Biochimie

A.Expression et purification de la toxine VapC7

Les cellules d'*Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS exprimant les gènes *vapBC7* dans le plasmide pET28a-Sm ont été cultivées dans 200 ml de milieu LB additionné de 30 μ g/ml de kanamycine et 34 μ g/ml de chloramphenicol jusqu'à une DO_{600nm} de 0,6 à 37°C. L'expression des gènes *vapBC7* a été induite avec 1 mM d'isopropyl- β -D-thiogalactoside pendant 3 heures à 37°C. Les cellules ont ensuite été récoltées par centrifugation et remises en suspension dans 3,5 mL/g de tampon de 50 mM NaH_2PO_4 pH 8, 300 mM de NaCl, 10 mM d'imidazole, 5 mM de β -mércaptoéthanol, en présence d'un mélange « protease inihibitor » (Roche, Complet comprimés Ultra Mini, EDTA libre) et 1 mg de lysozyme/ml. Après 20 min d'incubation dans la glace, la lyse des cellules a été réalisée par ultrasons avec un sonicateur Vibra-cell (impulsions toutes les 3s sur la puissance 5). L'extrait brut a été incubé 10 min dans la glace avec de la DNase I (5 μ g/ml) et de la RNase A (10 μ g/ml) et centrifugé à 10000 g pendant 20 min à 4°C. L'extrait de protéines solubles (4 ml) contenant VapB7 et VapC7His6 a été ajouté à 1 ml de résine Ni-NTA HisPur (ThermoScientific) et mélangé par agitation 90 min à 4°C. L'extrait soluble et la résine ont ensuite été chargés dans la colonne et lavés avec 2 x 5 ml de 50 mM NaH_2PO_4 pH 8, NaCl 300 mM, 50 mM imidazole, 5 mM β -

mercaptoéthanol. La protéine VapC7His6 a été éluée avec 8x 0,5 mL de 50 mM NaH₂PO₄ pH 8, NaCl 300 mM, 250 mM imidazole, 5 mM β-mercaptoéthanol. La concentration en protéine a été déterminée par la méthode de Bradford (Bio-Rad) et de la BSA comme standard. La protéine purifiée a été diluée à 0,2 µg/µl dans 50 mM Tris-HCl pH8, glycérol à 40% évitant la précipitation des protéines.

B. Caractérisation *in vitro* de l'activité ribonucléase de la toxine VapC7

Les différents essais ont été réalisés dans du tampon Tris HCl 50 mM pH 8 préparé dans de l'eau traitée au DEPC. La toxine VapC7 purifiée ((5,2, 10,4, 13 ou 52 pmoles) a été incubée avec 1,4 pmoles d'ARN MS2 (Roche) dans 30 µl de volume final de Tris-HCl pH8 50 mM pendant 30 min à 30°C. La réaction est arrêtée par addition du tampon de charge d'électrophorèse (Euromedex) et analysé par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,2%.

C. Electrophorèse des protéines et Western blot

Les protéines ont été séparées sur un gel de polyacrylamide 15% (p/v) en conditions dénaturantes (SDS-PAGE, le système mini-multiforme; Biorad) et colorées avec du bleu de Coomassie R250 (Biorad) ou transférées par électrophorèse sur membranes de nitrocellulose (Whatmann) grâce à un système de transfert électrophorétique (Biorad). Les immunotransferts ont été hybridées avec des anticorps de lapin anti-His (GenScript, 1/8000), lavés dans du TBS-T (TBS (Tris 10 mM pH 8, NaCl 15 mM) avec 0,1% de Tween 20) et incubés avec des anticorps de type IgG anti-lapin conjugué à la phosphatase alcaline (Sigma, 1/5000). Les immunotransferts ont été révélés en utilisant un substrat NBT-BCIP (Sigma).

Tableau 9. Souches utilisés dans le travail de thèse.

Souches bactériennes	Caractéristiques	Référence
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 α	supE44, Δ lacU169, hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1	Maniatis et al., 1982
MT616	pro-82, thi-1, hsdR17, supE44, recA56, pRK600n Cm ^R	Finan et al., 1986
BL21(DE3)pLysS	Δ lon, Δ ompT, pLysS Cm ^R	Novagen
BL21(DE3)pLysS/pET28A-vapB7	Dérivé de BL21(DE3)pLysS, Cm ^R , Km ^R	Ce travail
UNE52	S.17 pK19mob2-mutant <i>vapC3</i> Km ^R Sm ^R	Banque Bielefield (Pobigayla N. et al. 2006)
UNE53	S.17 pK19mob2-mutant <i>vapC11</i> Km ^R Sm ^R	Banque Bielefield (Pobigayla N. et al. 2006)
UNE54	pK19mob2 Ω Km ^R	Banque Bielefield (Pobigayla N. et al. 2006)
<i>Sinorhizobium meliloti</i>		
UNA402	WT 2011, Sm ^R	Rosenberg et al., 1981
vapC1; vapC3; vapC6; vapC8; vapC9; vapC10; vapC11	Dérivée de Sm2011, mutants d'inactivation pour les toxines VapC Sm ^R et Nm ^R à l'aide du pK19mob2 Ω HMB	ce travail
UNA405	Dérivée de Sm2011, miniTn5-STM contenant Neo ^R inséré dans le gène <i>vapC5</i>	Banque Bielefield (Pobigayla N. et al. 2006)
UNA405	Dérivée de Sm2011, miniTn5-STM contenant Neo ^R inséré dans le gène <i>vapC5</i>	Banque Bielefield (Pobigayla N. et al. 2006)
UNA404	Dérivée de Sm2011, miniTn5-STM contenant Neo ^R inséré dans le gène <i>vapC7</i>	Banque Bielefield (Pobigayla N. et al. 2006)
BM210	Dérivée de Sm1021, insertion d'une cassette avec un gène de résistance à la gentamycine dans le gène <i>vapB5</i>	Lipuma et al. 2014
GC140	Dérivée de Sm1021, délétion du module entier <i>vapBC5</i>	Lipuma et al. 2014

Tableau 10. Plasmides utilisés dans le travail de thèse.

Plasmides	Caractéristiques	Référence
pGEMT	Vecteur de clonage avec une oriR f1; Amp ^R	Promega
pRB96	promoteur <i>vapBC5::lacZ</i> dans le plasmide pEP82, Tet ^R	Lipuma et al. 2014
pRB97	promoteur <i>vapBC7::lacZ</i> dans le plasmide pEP82, Tet ^R	Ce travail
pEP82	TetR, dérivé de pRK290 sans promoteur avec gène de fusion <i>lacZ</i>	Elo et al. 1998
pET28A	Promoteur T7 lac Km ^R	Novagen
pET28A-vapC7	Insertion de <i>vapBC7</i> dans pET28A, Km ^R	Ce travail
pK19mob2ΩHMB	Km ^R (<i>E. coli</i>)/Nm ^R (<i>S. meliloti</i>)	Luo et al., 2005
pK19mob2ΩHMB - vapC3/vapC6/vapC8/vapC9/vapC10	Insertion d'un fragment interne de vapC3/6/8/9/10 dans pK19mob2Ω Km ^R	Ce travail
pBAD24	Promoteur inductible à l'arabinose, colE1 ori, Amp ^R	Guzman et al. 1995
pBAD-vapC1/vapC7/vapC8/vapC10	Insertion du gène <i>vapC</i> dans le pBAD24 en aval du promoteur pAraC	Ce travail
pRB114	Insertion de <i>vapC5</i> dans le pBAD24	Lipuma et al. 2014
pRB121	Insertion de <i>vapB5</i> dans le pBAD24	Lipuma et al. 2014
pGC165	Insertion de <i>vapC7</i> dans le pBAD24	Ce travail
pGC101	Insertion de <i>vapB7</i> dans le pBAD24	Ce travail
pGC107	Insertion de l'opéron <i>vapBC7</i> dans le pBAD24	Ce travail

Tableau 11. Tableau d'amorces utilisées pour les clonages des fragments internes des gènes *vapC* dans le pK19mob2ΩHMB (construction de mutants *vapC*) et des gènes *vapC* complets pour le clonage dans le vecteur d'expression pBAD24 (Tests de toxicité).

clonage fragment interne du gène <i>vapC</i> dans le pK19m ob2ΩH MB	Gène	Amorce interne sens	Amorce interne antisens
vapC1	smc02 657	TGCAAGCTTCGACACAAA CGTTCTGC TT G	CTGTACAAATTCAGGCACATTGC CTTTG
vapC2	smc01 932	TGCAAGCTTCATCAGCATCATCACCTG GA	CTGTACAGGCTGGAAAGTCCTTG GTATT
vapC3	smc01 177	TGCAAGCTTGGCTTCACAGATCATCG AC	CTGTACAGAGCCTGAGCGCTTGT TC
vapC4	smc01 521	Mutant publié	
vapC5	smc00 687	Mutant Tn5 disponible	
vapC6	smc03 137	TGCAAGCTCGTTCAGGTGCTTGGAGA AC	CTGTACAACAGTCGTCAATCCCT TTGC
vapC7	smc04 881	Mutant Tn5 disponible	
vapC8	smc00 393	TGCAAGCTCTGGACCGTCACTGAGGT TT	CTGTACAGCTACGGTTCACACAC TCGATC
vapC9	smc00 900	TGCAAGCTCG ATTGCCTTCA ATGAA CAG	CTGTACATTGTTTTTCTATGCC TGG
vapC10	smc02 987	TGCAAGCTTTCATTGACGCCTCGGTTA T	CTGTACAGATTGCAAGGAAGCG ATGAT

vapC11	smc02 715	TGCAAGCTGCGATATTGAACGAGGAA CC	CTGTACACAGGGCTATCGCATAT GAGTC
clonage des gènes de toxine vapC dans le pBAD24	Gène	Amorce interne sens	Amorce interne antisens
vapC9	smc00 900	ACGAGGATGGACTCggtctcTcATGGTC ATCGAC	GCTTCCTGGTCGACCAGCTGCGC G
vapC1	smc02 657	GCGTGGTCTCGCATGACGCTGGTCGA	TCGAGTCGACGATCTGCTTATTT C
vapC8	smc00 393	GCGGGATGACGATggtctcTcATGCTCT ATC	GAGGCTCCCTCGAGTCAGTCGC GA
vapC11	smc02 715	GAGCTTTGGGAGGGTCTCGCATGAGC TTCGTCG	TTTTCGGTCGACGGCGCAAGTGC TCTAAC
vapC10	smc02 987	TGTGGGGCGGTCTCTCATGCTGTTTCAT TG	CAGGGTTTGGCGTCGACTTCCGA TAGACC
vapC2	smc01 932	GAGAAGGTGGGTCTCGCATGGTAGG CGCAC	GATCACTAAGTTTAGGTCGACAA GCTCGCGAT

Tableau 12. Tableau d'amorces utilisées pour les RT-qPCR:

Gène	Amorce sens	Amorce anti sens
Leg	ATAGCTCATATGAGGCATTCAAA	GAGTTGAGGACTATCTTGTACT
NCR001	CACTTCTGACGCTAACTG	TGAACCTTCAATATAACCACC
Mtc27	TGAGGGAGCAACCAAATACC	GCGAAAACCAAGCTACCATC
40S	AAGAAGGGAAAGAGTGCTGCT	GGTGTCCAATTAACACTCAACC
Sma00324	GTGGAATCGGAAGCGAAAGA	GGTGATCTTATAGGCGTTGCG
16S	TCTACGGAATAACGCAGG	GTGTCTCAGTCCCAATGT
MtVPE	CCAGGGGTTCTTGGTATGCCCG	ACTGCCAGATTCACATGCCTCCA
MtCP6	CCTGCTGCTACTATTGCTGGATATG	CACTCGCATCAATGGCTACGG
MtRbohA	GCGCAACTCCTTTGATTAGC	GAAATAGGCTCGCTTGGTTG
MtRbohB	GCTCGCTCTGCTCTTATTGC	TGCGCTTG TAGACTACGC
MtRbohF	GAAGATGGCAAACCAAACTTG	TTCTGCGGTTTTTCGTGATCC
MtRbohI	CGCCTGCACAAGATTACCA	GTGTTTGAGTCCATTTGTTGCT
MtCP3	AGCATCTTACCCTACTG	ATATACATAAATCGCAAAT

- Ahidjo BA, Kuhnert D, McKenzie JL, Machowski EE, Gordhan BG, Arcus V, Abrahams GL, Mizrahi V** 2011. VapC Toxins from *Mycobacterium tuberculosis* Are Ribonucleases that Differentially Inhibit Growth and Are Neutralized by Cognate VapB Antitoxins. *PLoS ONE* **6**: e21738.
- Aizenman E, Engelberg-Kulka H, Glaser G** 1996. An *Escherichia coli* chromosomal "addiction module" regulated by guanosine 3',5'-bispyrophosphate: a model for programmed bacterial cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 6059–6063.
- Amitai S, Kolodkin-Gal I, Hananya-Melabashi M, Sacher A, Engelberg-Kulka H** 2009. *Escherichia coli* MazF leads to the simultaneous selective synthesis of both "death proteins" and "survival proteins". *PLoS Genet* **5**: e1000390.
- Arcus VL, McKenzie JL, Robson J, Cook GM** 2011. The PIN-domain ribonucleases and the prokaryotic VapBC toxin-antitoxin array. *Protein Eng Des Sel* **24**: 33–40.
- Audoly G, Vincentelli R, Edouard S, Georgiades K, Mediannikov O, Gimenez G, Socolovschi C, Mège J-L, Cambillau C** 2011. Effect of Rickettsial Toxin VapC on Its Eukaryotic Host. *PLoS ONE* **6**: e26528.
- Barea J-M, Pozo MJ, Azcon R, Azcon-Aguilar C** 2005. Microbial co-operation in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany* **56**: 1761–1778.
- Barnett MJ, Fisher RF, Jones T, Komp C, Abola AP, Barloy-Hubler F, Bowser L, Capela D, Galibert F** 2001. Nucleotide sequence and predicted functions of the entire *Sinorhizobium meliloti* pSymA megaplasmid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 9883–9888.
- Bayles KW** 2014. Bacterial programmed cell death: making sense of a paradox. *Nat Rev Micro* **12**: 63–69.
- Becana M, Matamoros MA, Udvardi M, Dalton DA** 2010. Recent insights into antioxidant defenses of legume root nodules. *New Phytologist* **188**: 960–976.
- Becker A, Bergès H, Krol E, Bruand C, Rüberg S, Capela D, Lauber E, Meilhoc E, Ampe F et al.** 2004. Global Changes in Gene Expression in *Sinorhizobium meliloti*

- 1021 under Microoxic and Symbiotic Conditions. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **17**: 292–303.
- Benyamina SM, Baldacci-Cresp F, Couturier J, Chibani K, Hopkins J, Bekki A, de L, Philippe, Rouhier N, Jacquot J-P** 2013. Two *Sinorhizobium meliloti* glutaredoxins regulate iron metabolism and symbiotic bacteroid differentiation. *Environmental Microbiology* **15**: 795–810.
- Berendsen RL, Pieterse C, Bakker P** 2012. The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in Plant Science* **17**: 478–486.
- Bernard P, Couturier M** 1992. Cell killing by the F plasmid CcdB protein involves poisoning of DNA-topoisomerase II complexes. *J Mol Biol* **226**: 735–745.
- Blower TR, Short FL, Rao F, Mizuguchi K, Pei XY, Fineran PC, Luisi BF, Salmond GPC** 2012. Identification and classification of bacterial Type III toxin-antitoxin systems encoded in chromosomal and plasmid genomes. *Nucleic Acids Research* **40**: 6158–6173.
- Bodogai M, Ferenczi S, Bashtovyy D, Miclea P, Papp P, Dusha I** 2006. The ntrPR operon of *Sinorhizobium meliloti* is organized and functions as a toxin-antitoxin module. *Mol Plant Microbe Interact* **19**: 811–822.
- Boman HG** 1995. Peptide Antibiotics and their Role in Innate Immunity. *Annual Review of Immunology* **13**: 61–92.
- Bonfante P, Anca I-A** 2009. Plants, Mycorrhizal Fungi, and Bacteria: A Network of Interactions. *Annual Review of Microbiology* **63**: 363–383.
- Bordes P, Cirinesi AM, Ummels R, Sala A, Sakr S, Bitter W, Genevaux P** 2011. SecB-like chaperone controls a toxin-antitoxin stress-responsive system in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 8438–8443.
- Boscari A, del G, Jennifer, Ferrarini A, Venturini L, Zaffini A-L, Delledonne M, Puppò A** 2013. Expression Dynamics of the *Medicago truncatula* Transcriptome during the Symbiotic Interaction with *Sinorhizobium meliloti*: Which Role for Nitric Oxide? *Plant Physiology* **161**: 425–439.
- Brantl S** 2012. Bacterial type I toxin-antitoxin systems. *RNA Biology* **9**: 1488–1490.

- Bueno P, Soto MJ, Rodriguez-Rosales MP, Sanjuan J, Olivares J, Donaire JP** 2001. Time-course of lipoxygenase, antioxidant enzyme activities and H₂O₂ accumulation during the early stages of Rhizobium-legume symbiosis. *New Phytologist* **152**: 91–96.
- Cam Y, Pierre O, Boncompagni E, Hérouart D, Meilhoc E, Bruand C** 2012. Nitric oxide (NO): a key player in the senescence of *Medicago truncatula* root nodules. *New Phytologist* **196**: 548–560.
- Capela D, Filipe C, Bobik C, Batut J, Bruand C** 2006. *Sinorhizobium meliloti* Differentiation During Symbiosis with Alfalfa: A Transcriptomic Dissection. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **19**: 363–372.
- Christensen-Dalsgaard M, Gerdes K** 2006. Two higBA loci in the *Vibrio cholerae* superintegron encode mRNA cleaving enzymes and can stabilize plasmids. *Mol Microbiol* **62**: 397–411.
- Christensen-Dalsgaard M, Jorgensen MG, Gerdes K** 2010. Three new RelE-homologous mRNA interferases of *Escherichia coli* differentially induced by environmental stresses. *Mol Microbiol* **75**: 333–348.
- Christensen SK, Pedersen K, Hansen FG, Gerdes K** 2003. Toxin-antitoxin loci as stress-response-elements: ChpAK/MazF and ChpBK cleave translated RNAs and are counteracted by tmRNA. *J Mol Biol* **332**: 809–819.
- Christensen SK, Gerdes K** 2004. Delayed-relaxed response explained by hyperactivation of RelE. *Molecular Microbiology* **53**: 587–597.
- Christensen SK, Maenhaut-Michel G, Mine N, Gottesman S, Gerdes K, Van Melderen L** 2004. Overproduction of the Lon protease triggers inhibition of translation in *Escherichia coli*: involvement of the yefM-yoeB toxin-antitoxin system. *Molecular Microbiology* **51**: 1705–1717.
- Coats V, Rumpho ME** 2014. The rhizosphere microbiota of plant invaders: an overview of recent advances in the microbiomics of invasive plants. *Frontiers in Microbiology* **5**:
- Coles M, Djuranovic S, Soding J, Frickey T, Koretke K, Truffault V, Martin J, Lupas AN** 2005. AbrB-like Transcription Factors Assume a Swapped Hairpin Fold that Is Evolutionarily Related to Double-Psi beta Barrels. *Structure* **13**: 919–928.

- Cook D, Dreyer D, Bonnet D, Howell M, Nony E, VandenBosch K** 1995. Transient induction of a peroxidase gene in *Medicago truncatula* precedes infection by *Rhizobium meliloti*. *The Plant Cell* **7**: 43–55.
- Daines DA, Wu MH, Yuan SY** 2007. VapC-1 of Nontypeable *Haemophilus influenzae* Is a Ribonuclease. *Journal of Bacteriology* **189**: 5041–5048.
- Damiani I, Baldacci-Cresp F, Hopkins J, Andrio E, Balzergue S, Lecomte P, Puppo A, Abad P, Favery B** 2012. Plant genes involved in harbouring symbiotic rhizobia or pathogenic nematodes. *New Phytologist* **194**: 511–522.
- Daniel R** 2005. The metagenomics of soil. *Nat Rev Micro* **3**: 470–478.
- Das U, Pogenberg V, Subhramanyam UKT, Wilmanns M, Gourinath S, Srinivasan A** 2014. Crystal structure of the VapBC-15 complex from *Mycobacterium tuberculosis* reveals a two-metal ion dependent PIN-domain ribonuclease and a variable mode of toxin-antitoxin assembly. *Journal of Structural Biology* **188**: 249–258.
- De La Cruz M, Zhao W, Farenc C, Gimenez G, Raoult D, Cambillau C, Gorvel J-P, Meresse S** 2013. A Toxin-Antitoxin Module of *Salmonella* Promotes Virulence in Mice. *PLoS Pathog* **9**: e1003827.
- Del Giudice J, Cam Y, Damiani I, Fung-Chat F, Meilhoc E, Bruand C, Brouquisse R, Puppo A, Boscari A** 2011. Nitric oxide is required for an optimal establishment of the *Medicago truncatula*-*Sinorhizobium meliloti* symbiosis. *New Phytologist* **191**: 405–417.
- Desiro A, Salvioli A, Ngonkeu EL, Mondo SJ, Epis S, Faccio A, Kaech A, Pawlowska TE, Bonfante P** 2014. Detection of a novel intracellular microbiome hosted in arbuscular mycorrhizal fungi. *The ISME Journal* **8**: 257–270.
- Dienemann C, Boggild A, Winther KS, Gerdes K, Brodersen DE** 2011. Crystal Structure of the VapBC Toxin-Antitoxin Complex from *Shigella flexneri* Reveals a Hetero-Octameric DNA-Binding Assembly. *Journal of Molecular Biology* **414**: 713–722.
- Dodds PN, Rathjen JP** 2010. Plant immunity: towards an integrated view of plant,Äipathogen interactions. *Nat Rev Genet* **11**: 539–548.

- Dupont L, Alloing G, Pierre O, El Meshli S, Hopkins J, Héroutart D, Frendo P** 2012. The Legume Root Nodule: From Symbiotic Nitrogen Fixation to Senescence. In: (Ed.) DTN, ed. *Senescence*.
- Elo P, Semsey S, Kereszt A, Nagy T, Papp P, Orosz L** 1998. Integrative promoter cloning plasmid vectors for *Rhizobium meliloti*. *FEMS Microbiol Lett* **159**: 7–13.
- Engelberg-Kulka H, Amitai S, Kolodkin-Gal I, Hazan R** 2006. Bacterial programmed cell death and multicellular behavior in bacteria. *PLoS Genet* **2**: e135.
- Ernst JD** 2012. The immunological life cycle of tuberculosis. *Nat Rev Immunol* **12**: 581–591.
- Farkas A, Maroti G, Durgo H, Gyorgypal Z, Lima RM, Medzihradzsky KF, Kereszt A, Mergaert P, Kondorosi E** 2014. *Medicago truncatula* symbiotic peptide NCR247 contributes to bacteroid differentiation through multiple mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**: 5183–5188.
- Fedorova M, van dM, Judith, Matsumoto PA, Cho J, Town CD, VandenBosch KA, Gantt JS, Vance CP** 2002. Genome-Wide Identification of Nodule-Specific Transcripts in the Model Legume *Medicago truncatula*. *Plant Physiology* **130**: 519–537.
- Ferguson GP, Roop RM, Walker GC** 2002. Deficiency of a *Sinorhizobium meliloti* bacA mutant in alfalfa symbiosis correlates with alteration of the cell envelope. *J Bacteriol* **184**: 5625–5632.
- Finan TM, Weidner S, Wong K, Buhrmester J, Chain P, Vorhölter FJ, Hernandez-Lucas I, Becker A, Cowie A** 2001. The complete sequence of the 1,683-kb pSymB megaplasmid from the N(2)-fixing endosymbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 9889–9894.
- Fontenelle C, Blanco C, Arrieta M, Dufour V, Trautwetter A** 2011. Resistance to organic hydroperoxides requires ohr and ohrR genes in *Sinorhizobium meliloti*. *BMC Microbiol BMC Microbiology* **11**: 100–100.
- Frampton RA, Aggio RB, Villas-Boas SG, Arcus VL, Cook GM** 2011. Toxin-antitoxin systems of mycobacterium smegmatis are essential for cell survival. *J Biol Chem*

- Frampton R, Aggio RBM, Villas-Boas SG, Arcus VL, Cook GM** 2012. Toxin-Antitoxin Systems of *Mycobacterium smegmatis* Are Essential for Cell Survival. *Journal of Biological Chemistry* **287**: 5340–5356.
- Frendo P, Harrison J, Norman C, Jimenez MJH, Van dS, Ghislaine, Gilabert A, Puppo A** 2005. Glutathione and Homoglutathione Play a Critical Role in the Nodulation Process of *Medicago truncatula*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **18**: 254–259.
- Frendo P, Matamoros MA, Alloing G, Becana M** 2013. Thiol-based redox signaling in the nitrogen-fixing symbiosis. *Front Plant Sci Frontiers in Plant Science* **4**: 376.
- Galbraith D, Harkins K, Maddox J, Ayres N, Sharma D, Firoozabady E** 1983. Rapid Flow Cytometric Analysis of the Cell Cycle in Intact Plant Tissues. *Science* **220**: 1049–1051.
- Galibert F, Finan TM, Long SR, Puhler A, Abola P, Ampe F, Barloy-Hubler F, Barnett MJ, Becker A** 2001. The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Science* **293**: 668–672.
- Galvez S, Hirsch AM, Wycoff KL, Hunt S, Layzell DB, Kondorosi A, Crespi M** 2000. Oxygen Regulation of a Nodule-Located Carbonic Anhydrase in Alfalfa. *Plant Physiology* **124**: 1059–1068.
- Georgiades K, Raoult D** 2011. Genomes of the Most Dangerous Epidemic Bacteria Have a Virulence Repertoire Characterized by Fewer Genes but More Toxin-Antitoxin Modules. *PLoS ONE* **6**: e17962.
- Gerdes K, Christensen SK, Lobner-Olesen A** 2005. Prokaryotic toxin-antitoxin stress response loci. *Nat Rev Microbiol* **3**: 371–382.
- Gerdes K, Maisonneuve E** 2012. Bacterial Persistence and Toxin-Antitoxin Loci. *Annual Review of Microbiology* **66**: 103–123.
- Germain E, Castro-Roa D, Zenkin N, Gerdes K** 2013. Molecular Mechanism of Bacterial Persistence by HipA. *Molecular Cell* **52**: 248–254.
- Gherbi H, Markmann K, Svistoonoff S, Estevan J, Autran D, Giczey G, Auguy F, Peret B, Laplaze L et al.** 2008. SymRK defines a common genetic basis for plant root

- endosymbioses with arbuscular mycorrhiza fungi, rhizobia, and Frankiabacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**: 4928–4932.
- Goeders N, Van Melderren L** 2014. Toxin-Antitoxin Systems as Multilevel Interaction Systems. *Toxins* **6**: 304–324.
- Goff SA, Goldberg AL** 1987. An increased content of protease La, the lon gene product, increases protein degradation and blocks growth in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* **262**: 4508–4515.
- Gonzalez V, Santamaria RI, Bustos P, Hernandez-Gonzalez I, Medrano-Soto A, Moreno-Hagelsieb G, Janga SC, Ramirez MA, Jimenez-Jacinto V** 2006. The partitioned *Rhizobium etli* genome: Genetic and metabolic redundancy in seven interacting replicons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 3834–3839.
- Graham MA, Silverstein KAT, Cannon SB, VandenBosch KA** 2004. Computational Identification and Characterization of Novel Genes from Legumes. *Plant Physiol Plant Physiology* **135**: 1179–1197.
- Gronlund H, Gerdes K** 1999. Toxin-antitoxin systems homologous with relBE of *Escherichia coli* plasmid P307 are ubiquitous in prokaryotes¹. *Journal of Molecular Biology* **285**: 1401–1415.
- Groten K, Dutilleul C, van H, Philippus D.R., Vanacker H, Bernard S, Finkemeier I, Dietz K-J, Foyer CH** 2006. Redox regulation of peroxiredoxin and proteinases by ascorbate and thiols during pea root nodule senescence. *FEBS Letters* **580**: 1269–1276.
- Guefrachi I, Nagymihaly M, Pislariu CI, Van dV, Willem, Ratet P, Mars M, Udvardi MK, Kondorosi E, Mergaert P** 2014. Extreme specificity of NCR gene expression in *Medicago truncatula*. *BMC Genomics* **15**: 712.
- Guzman LM, Belin D, Carson MJ, Beckwith J** 1995. Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *Journal of Bacteriology* **177**: 4121–4130.

- Gyorgyey J, Vaubert D, Jiménez-Zurdo JI, Charon C, Troussard L, Kondorosi Á, Kondorosi E** 2000. Analysis of *Medicago truncatula* Nodule Expressed Sequence Tags. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **13**: 62–71.
- Haag AF, Baloban M, Sani M, Kerscher B, Pierre O, Farkas A, Longhi R, Boncompagni E, Hérouart D** 2011. Protection of *Sinorhizobium* against Host Cysteine-Rich Antimicrobial Peptides Is Critical for Symbiosis. *PLoS Biology* **9**: e1001169.
- Haag AF, Kerscher B, Dall'Angelo S, Sani M, Longhi R, Baloban M, Wilson HM, Mergaert P, Zanda M** 2012. Role of Cysteine Residues and Disulfide Bonds in the Activity of a Legume Root Nodule-specific, Cysteine-rich Peptide. *Journal of Biological Chemistry* **287**: 10791–10798.
- Harrison J, Jamet A, Muglia CI, Van dS, Ghislaine, Aguilar OM, Puppo A, Frendo P** 2005. Glutathione Plays a Fundamental Role in Growth and Symbiotic Capacity of *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol Journal of Bacteriology* **187**: 168–174.
- Hayes F** 2003. Toxins-Antitoxins: Plasmid Maintenance, Programmed Cell Death, and Cell Cycle Arrest. *Science* **301**: 1496–1499.
- Helaine S, Cheverton AM, Watson KG, Faure LM, Matthews SA, Holden DW** 2014. Internalization of *Salmonella* by Macrophages Induces Formation of Nonreplicating Persisters. *Science* **343**: 204–208.
- Helaine S, Kugelberg E** 2014. Bacterial persisters: formation, eradication, and experimental systems. *Trends in Microbiology Trends in Microbiology* **22**: 417–424.
- Helaine S, Thompson JA, Watson KG, Liu M, Boyle C, Holden DW** 2010. Dynamics of intracellular bacterial replication at the single cell level. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**: 3746–3751.
- Hérouart D, Sigaud S, Moreau S, Frendo P, Touati D, Puppo A** 1996. Cloning and characterization of the *katA* gene of *Rhizobium meliloti* encoding a hydrogen peroxide-inducible catalase. *J Bacteriol* **178**: 6802–6809.
- Hood RD, Singh P, Hsu F, Guvener T, Carl MA, Trinidad RRS, Silverman JM, Ohlson BB, Hicks KG** 2010. A Type VI Secretion System of *Pseudomonas aeruginosa* Targets a Toxin to Bacteria. *Cell Host & Microbe* **7**: 25–37.

- Jamet A, Mandon K, Puppo A, Hérout D** 2007. H₂O₂ Is Required for Optimal Establishment of the *Medicago sativa*/*Sinorhizobium meliloti* Symbiosis. *Journal of Bacteriology* **189**: 8741–8745.
- Jamet A, Sigaud S, Van dS, Ghislaine, Puppo A, Hérout D** 2003. Expression of the Bacterial Catalase Genes During *Sinorhizobium meliloti*-*Medicago sativa* Symbiosis and Their Crucial Role During the Infection Process. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **16**: 217–225.
- Janssen PH** 2006. Identifying the Dominant Soil Bacterial Taxa in Libraries of 16S rRNA and 16S rRNA Genes. *Applied and Environmental Microbiology* **72**: 1719–1728.
- Jimenez-Zurdo JI, Valverde C, Becker A** 2012. Insights into the Noncoding RNome of Nitrogen-Fixing Endosymbiotic alpha-Proteobacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **26**: 160–167.
- Jones KM, Kobayashi H, Davies BW, Taga ME, Walker GC** 2007. How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium-Medicago* model. *Nat Rev Microbiol* **5**: 619–633.
- Kamada K, Hanaoka F** 2005. Conformational Change in the Catalytic Site of the Ribonuclease YoeB Toxin by YefM Antitoxin. *Molecular Cell* **19**: 497–509.
- Kaneko T, Nakamura Y, Sato S, Asamizu E, Kato T, Sasamoto S, Watanabe A, Idesawa K, Ishikawa A** 2000. Complete Genome Structure of the Nitrogen-fixing Symbiotic Bacterium *Mesorhizobium loti* (Supplement). *DNA Research* **7**: 381–406.
- Kasari V, Mets T, Tenson T, Kaldalu N** 2013. Transcriptional cross-activation between toxin-antitoxin systems of *Escherichia coli*. *BMC Microbiology* **13**: 45.
- Kaspy I, Rotem E, Weiss N, Ronin I, Balaban NQ, Glaser G** 2013. HipA-mediated antibiotic persistence via phosphorylation of the glutamyl-tRNA-synthetase. *Nat Commun* **4**:
- Kawano M, Aravind L, Storz G** 2007. An antisense RNA controls synthesis of an SOS-induced toxin evolved from an antitoxin. *Molecular Microbiology* **64**: 738–754.

- Keren I, Minami S, Rubin E, Lewis K** 2011. Characterization and Transcriptome Analysis of *Mycobacterium tuberculosis* Persisters. *mBio* **2**: e00100–11.
- Kolodkin-Gal I, Engelberg-Kulka H** 2006. Induction of *Escherichia coli* chromosomal mazEF by stressful conditions causes an irreversible loss of viability. *J Bacteriol* **188**: 3420–3423.
- Komi KK, Ge Y-M, Xin X-Y, Ojcius DM, Sun D, Hu W-L, Zhao X, Lin X, Yan J** 2015. ChpK and MazF of the toxin-antitoxin modules are involved in the virulence of *Leptospira interrogans* during infection. *Microbes and Infection* **17**: 34–47.
- Kondorosi E, Kondorosi A** 2004. Endoreduplication and activation of the anaphase-promoting complex during symbiotic cell development. *FEBS Letters* **567**: 152–157.
- Kondorosi E, Mergaert P, Kereszt A** 2013. A Paradigm for Endosymbiotic Life: Cell Differentiation of Rhizobium Bacteria Provoked by Host Plant Factors. *Annual Review of Microbiology* **67**: 611–628.
- Krol E, Becker A** 2011. ppGpp in *Sinorhizobium meliloti*: biosynthesis in response to sudden nutritional downshifts and modulation of the transcriptome. *Mol Microbiol* **81**: 1233–1254.
- Laranjo M, Alexandre A, Oliveira S** 2014. Legume growth-promoting rhizobia: An overview on the *Mesorhizobium* genus. *Microbiological Research* **169**: 2–17.
- Lehman AP, Long SR** 2013. Exopolysaccharides from *Sinorhizobium meliloti* Can Protect against H₂O₂-Dependent Damage. *Journal of Bacteriology* **195**: 5362–5369.
- Leplae R, Geeraerts D, Hallez R, Guglielmini J, Dreze P, Van Melderren L** 2011. Diversity of bacterial type II toxin-antitoxin systems: a comprehensive search and functional analysis of novel families. *Nucleic Acids Res* **39**: 5513–5525.
- Limpens E, Franken C, Smit P, Willemsse J, Bisseling T, Geurts R** 2003. LysM Domain Receptor Kinases Regulating Rhizobial Nod Factor-Induced Infection. *Science* **302**: 630–633.

- Lipuma J, Cinege G, Bodogai M, Olah B, Kiers A, Endre G, Dupont L, Dusha I** 2014. A vapBC-type toxin-antitoxin module of *Sinorhizobium meliloti* influences symbiotic efficiency and nodule senescence of *Medicago sativa*. *Environmental Microbiology*
- Lohar DP, Haridas S, Gantt JS, VandenBosch KA** 2007. A transient decrease in reactive oxygen species in roots leads to root hair deformation in the legume-rhizobia symbiosis. *New Phytologist* **173**: 39–49.
- Lopes APY, Lopes LM, Fraga TR, Chura-Chambi RM, Sanson AL, Cheng E, Nakajima E, Morganti L, Martins EAL** 2014. VapC from the Leptospiral VapBC Toxin-Antitoxin Module Displays Ribonuclease Activity on the Initiator tRNA. *PLoS ONE* **9**: e101678.
- Luo L, Yao S-Y, Becker A, Roberg S, Yu G-Q, Zhu J-B, Cheng H-P** 2005. Two New *Sinorhizobium meliloti* LysR-Type Transcriptional Regulators Required for Nodulation. *Journal of Bacteriology* **187**: 4562–4572.
- Magnuson R, Yarmolinsky MB** 1998. Corepression of the P1 Addiction Operon by Phd and Doc. *Journal of Bacteriology* **180**: 6342–6351.
- Maisonneuve E, Castro-Camargo M, Gerdes K** 2013. (p)ppGpp Controls Bacterial Persistence by Stochastic Induction of Toxin-Antitoxin Activity. *Cell* **154**: 1140–1150.
- Maisonneuve E, Gerdes K** 2014. Molecular Mechanisms Underlying Bacterial Persisters. *Cell* **157**: 539–548.
- Makarova KS, Wolf YI, Snir S, Koonin EV** 2011. Defense Islands in Bacterial and Archaeal Genomes and Prediction of Novel Defense Systems. *Journal of Bacteriology* **193**: 6039–6056.
- Marino D, Andrio E, Danchin EGJ, Oger E, Gucciardo S, Lambert A, Puppo A, Pauly N** 2011. A *Medicago truncatula* NADPH oxidase is involved in symbiotic nodule functioning. *New Phytologist* **189**: 580–592.
- Masson-Boivin C, Giraud E, Perret X, Batut J** 2009. Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many rhizobium recipes? *Trends in Microbiology* **17**: 458–466.

- Masuda H, Tan Q, Awano N, Wu K-P, Inouye M** 2012. YeeU enhances the bundling of cytoskeletal polymers of MreB and FtsZ, antagonizing the CbtA (YeeV) toxicity in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* **84**: 979–989.
- Masuda Y, Miyakawa K, Nishimura Y, Ohtsubo E** 1993. chpA and chpB, *Escherichia coli* chromosomal homologs of the pem locus responsible for stable maintenance of plasmid R100. *J Bacteriol* **175**: 6850–6856.
- Mattison K, Wilbur JS, So M, Brennan RG** 2006. Structure of FitAB from *Neisseria gonorrhoeae* Bound to DNA Reveals a Tetramer of Toxin-Antitoxin Heterodimers Containing Pin Domains and Ribbon-Helix-Helix Motifs. *Journal of Biological Chemistry* **281**: 37942–37951.
- Maunoury N, Redondo-Nieto M, Bourcy M, Van de Velde W, Alunni B, Laporte P, Durand P, Agier N, Marisa L** 2010. Differentiation of symbiotic cells and endosymbionts in *Medicago truncatula* nodulation are coupled to two transcriptome-switches. *PLoS One* **5**: e9519.
- McKenzie JL, Duyvestyn JM, Smith T, Bendak K, MacKay J, Cursons R, Cook GM, Arcus VL** 2012 Determination of ribonuclease sequence-specificity using Pentaprobosc and mass spectrometry. *RNA* **18**: 1267–1278.
- McKenzie JL, Robson J, Berney M, Smith TC, Ruthe A, Gardner PP, Arcus VL, Cook GM** 2012 A VapBC Toxin-Antitoxin Module Is a Posttranscriptional Regulator of Metabolic Flux in *Mycobacteria*. *Journal of Bacteriology* **194**: 2189–2204.
- Meeks JC, Elhai J** 2002. Regulation of Cellular Differentiation in Filamentous Cyanobacteria in Free-Living and Plant-Associated Symbiotic Growth States. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **66**: 94–121.
- Meilhoc E, Cam Y, Skapski A, Bruand C** 2010. The Response to Nitric Oxide of the Nitrogen-Fixing Symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **23**: 748–759.
- Mendes R, Garbeva P, Raaijmakers JM** 2013. The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. *FEMS Microbiology Reviews* **37**: 634–663.

- Mergaert P, Uchiumi T, Alunni B, Evanno G, Cheron A, Catrice O, Mausset AE, Barloy-Hubler F, Galibert F** 2006. Eukaryotic control on bacterial cell cycle and differentiation in the Rhizobium-legume symbiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 5230–5235.
- Mergaert P, Nikovics K, Kelemen Z, Maunoury N, Vaubert D, Kondorosi A, Kondorosi E** 2003. A Novel Family in *Medicago truncatula* Consisting of More Than 300 Nodule-Specific Genes Coding for Small, Secreted Polypeptides with Conserved Cysteine Motifs. *Plant Physiol Plant Physiology* **132**: 161–173.
- Metzger S, Dror IB, Aizenman E, Schreiber G, Toone M, Friesen JD, Cashel M, Glaser G** 1988. The nucleotide sequence and characterization of the *relA* gene of *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* **263**: 15699–15704.
- Miallau L, Faller M, Chiang J, Arbing M, Guo F, Cascio D, Eisenberg D** 2009. Structure and Proposed Activity of a Member of the VapBC Family of Toxin-Antitoxin Systems: VapBC-5 from *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Biological Chemistry* **284**: 276–283.
- Miclea PS, Peter M, Vegh G, Cinege G, Kiss E, Varo G, Horvath I, Dusha I** 2010. Atypical Transcriptional Regulation and Role of a New Toxin-Antitoxin-Like Module and Its Effect on the Lipid Composition of *Bradyrhizobium japonicum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **23**: 638–650.
- Milunovic B, diCenzo GC, Morton RA, Finan TM** 2014a. Cell Growth Inhibition upon Deletion of Four Toxin-Antitoxin Loci from the Megaplastids of *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol Journal of Bacteriology* **196**: 811–824.
- Min AB, Miallau L, Sawaya MR, Habel J, Cascio D, Eisenberg D** 2012. The crystal structure of the Rv0301-Rv0300 VapBC-3 toxin-antitoxin complex from *M. tuberculosis* reveals a Mg²⁺ ion in the active site and a putative RNA-binding site. *Protein Science Protein Science* **21**: 1754–1767.
- Mitra RM, Shaw SL, Long SR** 2004. Six nonnodulating plant mutants defective for Nod factor-induced transcriptional changes associated with the legume-rhizobia symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 10217–10222.

- Mitra RM, Long SR** 2004. Plant and Bacterial Symbiotic Mutants Define Three Transcriptionally Distinct Stages in the Development of the *Medicago truncatula*/*Sinorhizobium meliloti* Symbiosis *Plant Physiology* **134**: 595–604.
- Mitsui H, Sato T, Sato Y, Ito N, Minamisawa K** 2004. *Sinorhizobium meliloti* RpoH1 is required for effective nitrogen-fixing symbiosis with alfalfa. *Mol Genet Genomics* **271**: 416–425.
- Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van B, Frank** 2004. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science* **9**: 490–498.
- Moyed HS, Bertrand KP** 1983. HipA, a newly recognized gene of *Escherichia coli* K-12 that affects frequency of persistence after inhibition of murein synthesis. *J Bacteriol* **155**: 768–775.
- Mruk I, Kobayashi I** 2014. To be or not to be: regulation of restriction-modification systems and other toxin-antitoxin systems. *Nucleic Acids Research* **42**: 70–86.
- Mutschler H, Reinstein J, Meinhart A** 2010. Assembly Dynamics and Stability of the Pneumococcal Epsilon Zeta Antitoxin Toxin (PezAT) System from *Streptococcus pneumoniae*. *The Journal of Biological Chemistry* **285**: 21797–21806.
- Nallu S, Silverstein KAT, Samac DA, Bucciarelli B, Vance CP, VandenBosch KA** 2013. Regulatory Patterns of a Large Family of Defensin-Like Genes Expressed in Nodules of *Medicago truncatula*. *PLoS ONE* **8**: e60355.
- Nariya H, Inouye M** 2008. MazF, an mRNA interferase, mediates programmed cell death during multicellular Myxococcus development. *Cell* **132**: 55–66.
- Neubauer C, Gao YG, Andersen KR, Dunham CM, Kelley AC, Hentschel J, Gerdes K, Ramakrishnan V, Brodersen DE** 2009. The structural basis for mRNA recognition and cleavage by the ribosome-dependent endonuclease RelE. *Cell* **139**: 1084–1095.
- Newton AC, Fitt BDL, Atkins SD, Walters DR, Daniell TJ** 2010. Pathogenesis, parasitism and mutualism in the trophic space of microbe-plant interactions. *Trends in Microbiology* **18**: 365–373.

- Niehaus K, Lagares A, Pöhler A** 1998. A *Sinorhizobium meliloti* Lipopolysaccharide Mutant Induces Effective Nodules on the Host Plant *Medicago sativa* (Alfalfa) but Fails to Establish a Symbiosis with *Medicago truncatula*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **11**: 906–914.
- Ogier J-C, Pages S, Bisch G, Chiapello H, Modigue C, Rouy Z, Teyssier C, Vincent S, Tailliez P et al.** 2014. Attenuated Virulence and Genomic Reductive Evolution in the Entomopathogenic Bacterial Symbiont Species, *Xenorhabdus poinarii*. *Genome Biology and Evolution* **6**: 1495–1513.
- Ogura T, Hiraga S** 1983. Mini-F plasmid genes that couple host cell division to plasmid proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **80**: 4784–4788.
- Olah B, Kiss E, Gyorgypal Z, Borzi J, Cinege G, Csanadi G, Batut J, Kondorosi A, Dusha I** 2001. Mutation in the ntrR gene, a member of the vap gene family, increases the symbiotic efficiency of *Sinorhizobium meliloti*. *Mol Plant Microbe Interact* **14**: 887–894.
- Oldroyd GED** 2013. Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nat Rev Micro* **11**: 252–263.
- Oldroyd GED, Harrison MJ, Paszkowski U** 2009. Reprogramming Plant Cells for Endosymbiosis. *Science* **324**: 753–754.
- Oldroyd GED, Downie JA** 2008. Coordinating Nodule Morphogenesis with Rhizobial Infection in Legumes. *Annual Review of Plant Biology* **59**: 519–546.
- Oldroyd GED, Murray JD, Poole PS, Downie JA** 2011. The Rules of Engagement in the Legume-Rhizobial Symbiosis. *Annual Review of Genetics* **45**: 119–144.
- Pandey DP, Gerdes K** 2005a. Toxin-antitoxin loci are highly abundant in free-living but lost from host-associated prokaryotes. *Nucleic Acids Res* **33**: 966–976.
- Pandey DP, Gerdes K** 2005b. Toxin-antitoxin loci are highly abundant in free-living but lost from host-associated prokaryotes. *Nucleic Acids Res* **33**: 966–976.
- Paszkowski U** 2006. Mutualism and parasitism: the yin and yang of plant symbioses. *Current Opinion in Plant Biology* **9**: 364–370.

- Pauly N, Pucciariello C, Mandon K, Innocenti G, Jamet A, Baudouin E, Hérouart D, Frendo P, Puppo A** 2006. Reactive oxygen and nitrogen species and glutathione: key players in the legume, Rhizobium symbiosis. *Journal of Experimental Botany* **57**: 1769–1776.
- Pawlowski K, Demchenko K** 2012. The diversity of actinorhizal symbiosis. *Protoplasma* **249**: 967–979.
- Pedersen K, Christensen SK, Gerdes K** 2002. Rapid induction and reversal of a bacteriostatic condition by controlled expression of toxins and antitoxins. *Mol Microbiol* **45**: 501–510.
- Penterman J, Abo RP, De N, Nicole J., Arnold MFF, Longhi R, Zanda M, Walker GC** 2014. Host plant peptides elicit a transcriptional response to control the *Sinorhizobium meliloti* cell cycle during symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**: 3561–3566.
- Pérez G, Juan Carlos, Coussens G, De K, Annick, De R, Riet, De B, Stefanie, Van DV, Willem, Goormachtig S, Holsters M** 2010. Comparison of Developmental and Stress-Induced Nodule Senescence in *Medicago truncatula*. *Plant Physiology* **152**: 1574–1584.
- Perret X, Staehelin C, Broughton WJ** 2000. Molecular Basis of Symbiotic Promiscuity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **64**: 180–201.
- Pierre O, Engler G, Hopkins J, Brau F, Boncompagni E, Hérouart D** 2013. Peribacteroid space acidification: a marker of mature bacteroid functioning in *Medicago truncatula* nodules. *Plant, Cell & Environment* **36**: 2059–2070.
- Pierre O, Hopkins J, Combier M, Baldacci F, Engler G, Brouquisse R, Hérouart D, Boncompagni E** 2014. Involvement of papain and legumain proteinase in the senescence process of *Medicago truncatula* nodules. *New Phytologist* **202**: 849–863.
- Pladys D, Vance CP** 1993. Proteolysis during Development and Senescence of Effective and Plant Gene-Controlled Ineffective Alfalfa Nodules. *Plant Physiology* **103**: 379–384.
- Pobigaylo N, Wetter D, Szymczak S, Schiller Ulf, Kurtz S, Meyer F, Nattkemper TW, Becker A** 2006. Construction of a Large Signature-Tagged Mini-Tn5 Transposon

- Library and Its Application to Mutagenesis of *Sinorhizobium meliloti*. *Applied and Environmental Microbiology* **72**: 4329–4337.
- Puppo A, Groten K, Bastian F, Carzaniga R, Soussi M, Lucas MM, de Felipe MR, Harrison J, Vanacker H** 2005. Legume nodule senescence: roles for redox and hormone signalling in the orchestration of the natural aging process. *New Phytol* **165**: 683–701.
- Puppo A, Pauly N, Boscari A, Mandon K, Brouquisse R** 2013. Hydrogen peroxide and nitric oxide: key regulators of the Legume-Rhizobium and mycorrhizal symbioses. *Antioxid Redox Signal* **18**: 2202–2219.
- Puskas LG, Nagy ZB, Kelemen JZ, Ruberg S, Bodogai M, Becker A, Dusha I** 2004. Wide-range transcriptional modulating effect of ntrR under microaerobiosis in *Sinorhizobium meliloti*. *Mol Genet Genomics* **272**: 275–289.
- Ramage HR, Connolly LE, Cox JS** 2009. Comprehensive functional analysis of *Mycobacterium tuberculosis* toxin-antitoxin systems: implications for pathogenesis, stress responses, and evolution. *PLoS Genet* **5**: e1000767.
- Redondo FJ, de IP, Teodoro Coba, Morcillo CN, Lucas MM, Pueyo JJ** 2009. Overexpression of Flavodoxin in Bacteroids Induces Changes in Antioxidant Metabolism Leading to Delayed Senescence and Starch Accumulation in Alfalfa Root Nodules. *Plant Physiology* **149**: 1166–1178.
- Remy W, Taylor TN, Hass H, Kerp H** 1994. Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **91**: 11841–11843.
- Ren D, Walker A, Daines D** 2012. Toxin-antitoxin loci vapBC-1 and vapXD contribute to survival and virulence in nontypeable *Haemophilus influenzae*. *BMC Microbiology* **12**: 263.
- Robledo M, Frage B, Wright PR, Becker A** 2015. A Stress-Induced Small RNA Modulates Alpha-Rhizobial Cell Cycle Progression. *PLoS Genet* **11**: e1005153.

- Robson J, McKenzie JL, Cursons R, Cook GM, Arcus VL** 2009. The vapBC Operon from *Mycobacterium smegmatis* is an autoregulated Toxin–Antitoxin module that controls growth via inhibition of translation. *Journal of Molecular Biology* **390**: 353 – 367.
- Roux B, Rodde N, Jardinaud M-F, Timmers T, Sauviac L, Cottret L, Carrère S, Sallet E, Courcelle E** 2014. An integrated analysis of plant and bacterial gene expression in symbiotic root nodules using laser-capture microdissection coupled to RNA sequencing. *The Plant Journal* **77**: 817–837.
- Sala A, Calderon V, Bordes P, Genevax P** 2013. TAC from *Mycobacterium tuberculosis*: a paradigm for stress-responsive toxin-antitoxin systems controlled by SecB-like chaperones. *Cell Stress and Chaperones* **18**: 129–135.
- Sallet E, Roux B, Sauviac L, Jardinaud M-F, Carrère S, Faraut T, de C-N, Fernanda, Gouzy J, Gamas P** 2013. Next-Generation Annotation of Prokaryotic Genomes with EuGene-P: Application to *Sinorhizobium meliloti* 2011. *DNA Research* **20**: 339–354.
- Salvioli A, Lumini E, Anca IA, Bianciotto V, Bonfante P** 2008. Simultaneous detection and quantification of the unculturable microbe *Candidatus Glomeribacter gigasporarum* inside its fungal host *Gigaspora margarita*. *New Phytologist* **180**: 248–257.
- Santos R, Herouart D, Sigaud S, Touati D, Puppo A** 2001. Oxidative burst in alfalfa-*Sinorhizobium meliloti* symbiotic interaction. *Mol Plant Microbe Interact* **14**: 86–89.
- Sato S, Nakamura Y, Kaneko T, Asamizu E, Kato T, Nakao M, Sasamoto S, Watanabe A, Ono A** 2008. Genome Structure of the Legume, *Lotus japonicus*. *DNA Research* **15**: 227–239.
- Sawada H, Kuykendall L, David, Young J, M.** 2003. Changing concepts in the systematics of bacterial nitrogen-fixing legume symbionts. *The Journal of General and Applied Microbiology* **49**: 155–179.
- Schifano JM, Edifor R, Sharp JD, Ouyang M, Konkimalla A, Husson RN, Woychik NA** 2013. Mycobacterial toxin MazF-mt6 inhibits translation through cleavage of 23S rRNA at the ribosomal A site. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**: 8501–8506.

- Sevin EW, Barloy-Hubler F** 2007. RASTA-Bacteria: a web-based tool for identifying toxin-antitoxin loci in prokaryotes. *Genome Biol* **8**: R155.
- Shah D, Zhang Z, Khodursky A, Kaldalu N, Kurg K, Lewis K** 2006. Persisters: a distinct physiological state of *E. coli*. *BMC Microbiol* **6**: 53.
- Shao Y, Harrison EM, Bi D, Tai C, He X, Ou HY, Rajakumar K, Deng Z** 2011. TADB: a web-based resource for type 2 toxin-antitoxin loci in bacteria and archaea. *Nucleic Acids Res* **39**: D606–611.
- Short FL, Pei XY, Blower TR, Ong S-L, Fineran PC, Luisi BF, Salmond GPC** 2013. Selectivity and self-assembly in the control of a bacterial toxin by an antitoxic noncoding RNA pseudoknot. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**: E241–E249.
- Smith SE, Jakobsen I, Grunlund M, Smith FA** 2011. Roles of Arbuscular Mycorrhizas in Plant Phosphorus Nutrition: Interactions between Pathways of Phosphorus Uptake in Arbuscular Mycorrhizal Roots Have Important Implications for Understanding and Manipulating Plant Phosphorus Acquisition. *Plant Physiology* **156**: 1050–1057.
- Spaink HP** 2000. Root Nodulation and Infection Factors Produced by Rhizobial Bacteria. *Annual Review of Microbiology* **54**: 257–288.
- Starkov AA** 2008. The Role of Mitochondria in Reactive Oxygen Species Metabolism and Signaling. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1147**: 37–52.
- Stewart GR, Wernisch L, Stabler R, Mangan JA, Hinds J, Laing KG, Young DB, Butcher PD** 2002. Dissection of the heat-shock response in *Mycobacterium tuberculosis* using mutants and microarrays. *Microbiology* **148**: 3129–3138.
- Streng A, op dC, Rik, Bisseling T, Geurts R** 2011. Evolutionary origin of rhizobium Nod factor signaling. *Plant Signaling & Behavior* **6**: 1510–1514.
- Suliman S, Schulze J** 2010. The efficiency of nitrogen fixation of the model legume *Medicago truncatula* (Jemalong A17) is low compared to *Medicago sativa*. *Journal of Plant Physiology* **167**: 683–692.

- Summers ML, Botero LM, Busse SC, McDermott TR** 2000. The *Sinorhizobium meliloti* Lon Protease Is Involved in Regulating Exopolysaccharide Synthesis and Is Required for Nodulation of Alfalfa. *Journal of Bacteriology* **182**: 2551–2558.
- Tan Q, Awano N, Inouye M** 2011. YeeV is an *Escherichia coli* toxin that inhibits cell division by targeting the cytoskeleton proteins, FtsZ and MreB. *Molecular Microbiology* **79**: 109–118.
- Tiricz H, Szucs A, Farkas A, Pap B, Lima RM, Maroti G, Kondorosi E, Kereszt A** 2013. Antimicrobial nodule-specific cysteine-rich peptides induce membrane depolarization associated changes in the transcriptome of *Sinorhizobium meliloti*. *Applied and Environmental Microbiology*
- Torres-Quesada O, Oruezabal RI, Peregrina A, Jofré E, Lloret J, Rivilla R, Toro N, Jimenez-Zurdo JI** 2010. The *Sinorhizobium meliloti* RNA chaperone Hfq influences central carbon metabolism and the symbiotic interaction with alfalfa. *BMC Microbiology* **10**: 71–71.
- Torsvik V, øvreås L** 2002. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current Opinion in Microbiology* **5**: 240–245.
- Tran TT, Zhou F, Marshburn S, Stead M, Kushner SR, Xu Y** 2009. De novo computational prediction of non-coding RNA genes in prokaryotic genomes. *Bioinformatics* **25**: 2897–2905.
- Unterholzner SJ, Poppenberger B, Rozhon W** 2013. Toxin antitoxin systems: Biology, identification, and application. *Mobile Genetic Elements mge* **3**: e26219.
- Van de Velde W, Guerra JC, De Keyser A, De Rycke R, Rombauts S, Maunoury N, Mergaert P, Kondorosi E, Holsters M** 2006. Aging in legume symbiosis. A molecular view on nodule senescence in *Medicago truncatula*. *Plant Physiol* **141**: 711–720.
- Van de Velde W, Zehirov G, Szatmari A, Debreczeny M, Ishihara H, Kevei Z, Farkas A, Mikulass K, Nagy A** 2010. Plant Peptides Govern Terminal Differentiation of Bacteria in Symbiosis. *Science* **327**: 1122–1126.
- Van Melderden L** 2010. Toxin-antitoxin systems: why so many, what for? *Curr Opin Microbiol* **13**: 781–785.

- Van Melderén L, Bernard P, Couturier M** 1994. Lon-dependent proteolysis of CcdA is the key control for activation of CcdB in plasmid-free segregant bacteria. *Molecular Microbiology* **11**: 1151–1157.
- Van Melderén L, Saavedra DB, M** 2009. Bacterial toxin-antitoxin systems: more than selfish entities? *PLoS Genet* **5**: e1000437.
- Vasse J, de Billy F, Camut S, Truchet G** 1990. Correlation between ultrastructural differentiation of bacteroids and nitrogen fixation in alfalfa nodules. *J Bacteriol* **172**: 4295–4306.
- Vinardell JM, Fedorova E, Cebolla A, Kevei Z, Horvath G, Kelemen Z, Tarayre S, Roudier F, Mergaert P** 2003. Endoreduplication Mediated by the Anaphase-Promoting Complex Activator CCS52A Is Required for Symbiotic Cell Differentiation in *Medicago truncatula* Nodules. *The Plant Cell Online* **15**: 2093–2105.
- Wang C, Saldanha M, Sheng X, Shelswell KJ, Walsh KT, Sobral BWS, Charles TC** 2007. Roles of poly-3-hydroxybutyrate (PHB) and glycogen in symbiosis of *Sinorhizobium meliloti* with *Medicago sp.* *Microbiology* **153**: 388–398.
- Wang D, Griffiths J, Starker C, Fedorova E, Limpens E, Ivanov S, Bisseling T, Long S** 2010. A Nodule-Specific Protein Secretory Pathway Required for Nitrogen-Fixing Symbiosis. *Science* **327**: 1126–1129.
- Wang X, Lord DM, Cheng H-Y, Osbourne DO, Hong SH, Sanchez-Torres V, Quiroga C, Zheng K, Herrmann T** 2012. A new type V toxin-antitoxin system where mRNA for toxin GhoT is cleaved by antitoxin GhoS. *Nat Chem Biol* **8**: 855–861.
- Wani SP, Rupela OP, Lee KK** 1995. Sustainable agriculture in the semi-arid tropics through biological nitrogen fixation in grain legumes. *Plant Soil* **174**: 29–49.
- Willems A** 2006. The taxonomy of rhizobia: an overview. *Plant Soil* **287**: 3–14.
- Winther KS, Brodersen DE, Brown AK, Gerdes K** 2013. VapC20 of *Mycobacterium tuberculosis* cleaves the Sarcin-Ricin loop of 23S rRNA. *Nat Commun* **4**:
- Winther KS, Gerdes K** 2012 Regulation of Enteric vapBC Transcription: Induction by VapC Toxin Dimer-Breaking. *Nucleic Acids Research* **40**: 4347–4357.

- Winther KS, Gerdes K** 2011. Enteric virulence associated protein VapC inhibits translation by cleavage of initiator tRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 7403–7407.
- Woese CR, Stackebrandt E, Weisburg WG, Paster BJ, Madigan MT, Fowler VJ, Hahn CM, Blanz P, Gupta R** 1984. The phylogeny of purple bacteria: The alpha subdivision. *Systematic and Applied Microbiology* **5**: 315–326.
- Yamaguchi Y, Inouye M** 2011. Regulation of growth and death in *Escherichia coli* by toxin-antitoxin systems. *Nat Rev Microbiol* **9**: 779–790.
- Yang M, Gao C, Wang Y, Zhang H, He Z-G** 2010. Characterization of the Interaction and Cross-Regulation of Three *Mycobacterium tuberculosis* RelBE Modules. *PLoS One* **5**: e10672.
- Young JPW, Crossman LC, Johnston AWB, Thomson NR, Ghazoui ZF, Hull KH, Wexler M, Curson ARJ, Todd JD** 2006. The genome of *Rhizobium leguminosarum* has recognizable core and accessory components. *Genome Biol Genome Biology* **7**: R34–R34.
- Young ND, Debellé F, Oldroyd GED, Geurts R, Cannon SB, Udvardi MK, Benedito VA, Mayer KFX, Gouzy J** 2011. The *Medicago* Genome Provides Insight into the Evolution of Rhizobial Symbioses. *Nature* **480**: 520–524.
- Zhang Y, Zhang J, Hara H, Kato I, Inouye M** 2005. Insights into the mRNA cleavage mechanism by MazF, an mRNA interferase. *J Biol Chem* **280**: 3143–3150.
- Zhang Y, Yamaguchi Y, Inouye M** 2009. Characterization of YafO, an *Escherichia coli* Toxin. *Journal of Biological Chemistry* **284**: 25522–25531.
- Zhu L, Phadtare S, Nariya H, Ouyang M, Husson RN, Inouye M** 2008. The mRNA interferases, MazF-mt3 and MazF-mt7 from *Mycobacterium tuberculosis* target unique pentad sequences in single-stranded RNA. *Molecular Microbiology* **69**: 559–569.
- Zhu L, Sharp JD, Kobayashi H, Woychik NA, Inouye M** 2010. Noncognate *Mycobacterium tuberculosis* Toxin-Antitoxins Can Physically and Functionally Interact. *Journal of Biological Chemistry* **285**: 39732–39738.

Zorzini V, Buts L, Schrank E, Sterckx YGJ, Respondek M, Engelberg-Kulka H, Loris R, Zangger K, van N, Nico A.J. 2015. *Escherichia coli* antitoxin MazE as transcription factor: insights into MazE-DNA binding. *Nucleic Acids Research* **43**: 1241–1256.